E 1330

studii și cercetări de biochimie

1

TOMUL 9

1966

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

St. cerc. biochimie, tomul 9, nr. 1, 1—120, București, februarie 1966

COMITETUL DE REDACȚIE

Redactor responsabil:

Academician E. MACOVSCHI

Redactor responsabil adjunct:

H. SLUȘANSCHI

Membri:

S. OERIU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România ; EUGENIA SORU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România ; M. MEZINCESCU, I. VASILESCU, TR. RĂDULESCU, VICTORIA ALEXANDRESCU.

Secretar de redacție:

VICTOR GHEȚIE

Revista apare de 4 ori pe an.

Prețul unui abonament anual este de 48 lei.

În țară abonamentele se fac la oficiile poștale, agențiile poștale, factorii poștali și difuzorii voluntari din întreprinderi și instituții.

Orice comandă din străinătate (numere izolate sau abonamente) se face prin : CARTIMEX, Căsuța poștală 134—135, București, Republica Socialistă România, sau prin reprezentanții săi din străinătate.

Manuscrisele, cărțile și revistele pentru schimb, precum și orice corespondență se vor trimite pe adresa comitetului de redacție al revistei „Studii și cercetări de biochimie".

ADRESA REDACȚIEI :

București, *str. Docenților nr. 20*
Raionul 30 Decembrie

MŰSZAKI KÖNYVTÁRES DOKUMENTÁCIÓS KÖZPONT 1883

STUDII ŞI CERCETĂRI DE
BIOCHIMIE

Tomul 9 (1966) Nr. 1

SUMAR

Pag.

E. MACOVSCHI, Materia vie şi problema raporturilor dintre medicamente şi enzime 3

I. BRAD, Contribuţii la studiul biochimiei rezistenţei la ger a cerealelor de toamnă. Nota III. Studiul comparativ al activităţii peroxidazei la cereale de toamnă în timpul iernii 11

L. BUZILĂ, Purificarea crioproteinei din mazăre sub control imunochimic 21

I. DINU, Influenţa suplimentării mălaiului cu vitamine şi aminoacizi asupra activităţii unor enzime din ficat 25

I. A. MOLNAR, J. WINTER, E. TUCICOV, V. PELLONI şi N. URICARU, Mucopolizaharide din diverse ţesuturi ale tractului digestiv . . 33

I. A. MOLNAR şi J. WINTER, Studiul electroforetic şi metacromatic al mucopolizaharidelor din ţesuturile tractului digestiv 39

I. A. MOLNAR, M. SIMIONOVICI, E. TUCICOV, C. M. GEORGESCU şi J. WINTER, Acţiunea mucopolizaharidelor din ţesuturile tractului digestiv asupra metabolismului lipidic 49

D. MOŢOC şi B. SEGAL, Influenţa enzimelor pectolitice ale mucegaiurilor asupra complexului enzimatic al strugurilor 57

REFERATE GENERALE

L. M. BURUIANĂ, Fizico-chimia proceselor enzimatice şi importanţa lor practică 67

M. FURNICĂ, Agenţii alchilanţi şi influenţa lor asupra activităţii enzimelor 81

V. GHEŢIE, Degradarea proteinelor de rezervă din sămînţă în procesul germinativ 91

EUG. PĂUNESCU, Modificări enzimatice sub acţiunea tuberculostaticelor 107

RECENZIE 117

St. cerc biochimie, tomul 9, nr. 1, p. 1—120, Bucureşti, februarie 1966

ST. CERC. BIOCHIM., 9, 1, 3–10 (1966)

MŰSZAKI KÖNYVTÁRES DOKUMENTÁCIÓS KÖZPONT

MATERIA VIE ŞI PROBLEMA RAPORTURILOR DINTRE MEDICAMENTE ŞI ENZIME *

ACAD. PROF. DR. **EUGEN MACOVSCHI**

577 : 22

Rezumat. — Concepţia despre existenţa în protoplasma vie a două feluri de materie — vie şi nevie — permite intuirea unei serii de relaţii dintre medicamente şi enzime, dacă se ţine seama de : starea enzimelor integrate în structura materiei vii, evoluţia structurii materiei vii şi a componentelor sale, repercusiunile acţiunii directe a medicamentelor asupra materiei vii, raporturile dintre fenomenele de ordin chimic care se produc în cele două materii coexistente şi legitatea fenomenelor biologice din protoplasmă.

Această lucrare are ca scop prezentarea relaţiilor dintre medicamente şi enzime de pe poziţiile unei concepţii noi despre natura şi structura materiei vii [1] — [9].

Conform acestei concepţii, protoplasma vie este alcătuită din două feluri de materie, formate principial din aceleaşi particule materiale : materia vie şi materia nevie. Aceste două feluri de materie se întrepătrund, materia vie fiind în relaţii de coexistenţă funcţională cu materia nevie [1], [2].

Materia nevie a protoplasmei este alcătuită din diferiţi compuşi chimici organici şi anorganici, care împreună cu materia vie condiţionează viaţa protoplasmei. În structura materiei nevii moleculele diferitelor substanţe îşi păstrează specificul şi autonomia lor şi de aceea materia nevie a protoplasmei se prezintă ca o formaţiune de natură dispersă şi cu caracter discret [1], [2].

Altfel se prezintă situaţia în cazul materiei vii.

Materia vie, existentă numai în protoplasma vie, are o structură cu totul specială, de natură continuă şi caracter unitar, corespunzătoare unei trepte superioare de dezvoltare a materiei ; această structură se deosebeşte calitativ de structura materiei nevii şi imprimă protoplasmei acele însuşiri şi stări specifice, ale căror manifestări urmează legi biologice [1], [2], [8].

Materia vie se formează prin asimilaţia, adică prin integrarea în structura ei a diferitelor substanţe existente în materia nevie coexistentă.

---

* Lucrare prezentată la simpozionul „Medicamente şi enzime" organizat la Cluj, la 26–27 noiembrie 1965.

În cadrul acestui proces de asimilație, particula care este asimilată (moleculă, radical, ion) vine în interacțiune cu componentele structurii materiei vii. Influențele reciproce între ele fac ca atît particula, cît și aceste componente, să sufere „deformări"*. Apariția acestor „deformări" modifică condițiile de manifestare a interacțiunilor; în consecință, apar noi „deformări", urmate de noi modificări ale condițiilor interacțiunii etc. Astfel, particula care se asimilează își pierde progresiv specificul și autonomia sa și devine parte integrantă a unei structuri în care toate celelalte componente, unite mai înainte prin legături corelative, și-au pierdut de asemenea specificul și autonomia lor. Prin urmare, structura materiei vii, în care componentele — unite prin legături corelative — și-au pierdut autonomia, se prezintă ca un „întreg" aflat în continuă dezvoltare, în cadrul căruia se realizează acea formă biologică de mișcare a materiei, superioară formelor de mișcare fizică și chimică, care este caracteristică vieții [8].

Se înțelege că o structură superioară celei chimice nu poate fi reprezentată și exprimată numai prin simbolurile chimice actuale. După cum în matematică apariția fiecărui gen nou de calcul (determinanți, calculul diferențial, calculul integral etc.) a necesitat introducerea unor simboluri noi, adecvate, tot așa și cercetarea structurii materiei vii va necesita elaborarea unei simbolistici noi, capabilă să exprime și să reprezinte nu numai compoziția, structura și starea diferitelor componente ale materiei vii, aflate în continuă evoluție, dar și funcțiile lor, precum și fenomenele biologice elementare care se produc în această materie [8].

Masa materiei vii, cu alcătuirea ei de natură continuă și structura ei cu caracter „unitar", este spongioasă, fiind străbătută, ca un burete, de un sistem de spații canaliculare, anastomozate, ocupate de materia nevie cu alcătuirea de natură „dispersă" și structura cu caracter „discontinuu". Prin această întrepătrundere a celor două feluri de materie care alcătuiesc protoplasma vie, se asigură relațiile de permanentă transformare reciprocă a lor [1], [2].

Pornind de la concepția de mai sus, se pot face cîteva deducții care permit precizarea diferitelor aspecte ale relațiilor dintre medicamente și enzime.

Prima deducție *se referă la componentele structurii materiei vii.*

Deși nu dispunem încă de date concrete cu privire la starea în care se află componentele materiei vii, putem totuși afirma că integrarea în această materie a diferitelor substanțe, ca proteine, acizi nucleici, fosfolipide și altele nu implică numaidecît modificarea structurii chimice primare a acestora. În adevăr, dacă prin asimilație proteinele, acizii nucleici și alte substanțe și-ar pierde sau și-ar modifica nereversibil structura lor chimică, atunci nu ar fi posibilă menținerea calității materiei vii, caracteristică fiecărui fel de organism în parte. Aceasta înseamnă că „deformările" care se produc la nivelul componentelor materiei vii afectează nu atît structura chimică primară a acestora, cît structurile lor de ordin

* Sub termenul general de „deformare" vom înțelege aici orice modificare, indiferent de natura ei, care se produce la nivelul componentelor materiei vii sub influența interacțiunilor cu alte componente.

superior. De aceea o moleculă, integrîndu-se prin asimilație în structura materiei vii, deși își pierde specificul său de moleculă, redevine totuși moleculă atunci cînd se individualizează din structura acestei materii. Prin urmare — deși pare paradoxal — molecula integrată în structura materiei vii este, și totodată nu mai este ceea ce a fost înainte de integrare [7], [8].

Din moment ce moleculele devenite prin asimilație componente ale materiei vii prezintă, în noua lor calitate, însușiri și stări deosebite de cele pe care le-au avut atunci cînd erau în stare de molecule, înseamnă că și integrarea moleculelor de enzime în structura materiei vii este însoțită de anumite „deformări" și deci de modificarea mai mult sau mai puțin profundă a însușirilor lor catalitice. Prin urmare, activitatea unei enzime care prin asimilație a devenit componentă structurii materiei vii poate fi diferită de aceea pe care enzima respectivă o exercită atunci cînd se află sub formă de molecule în materia nevie a protoplasmei sau în omogenate și soluții pe care le cercetăm *in vitro*.

Pentru problema relațiilor dintre medicamente și enzime, punctul acesta de vedere prezintă interes fiindcă, în principiu, ne permite să prevedem unele interacțiuni posibile între medicamente și enzimele integrate în structura materiei vii. De exemplu : un medicament poate avea însușirea de a acționa direct asupra moleculelor unei enzime provocînd activarea, inhibarea sau chiar blocarea activității lor catalitice. Dar același medicament poate fi cu totul inactiv asupra aceleiași enzime, atunci cînd aceasta — în calitate de componentă „deformată" — face parte integrantă din structura materiei vii. Într-un asemenea caz, medicamentul influențează în mod corespunzător activitatea enzimei numai *in vitro*, pe cînd *in vivo* rămîne fără efect asupra enzimei respective.

Este posibil și cazul invers, cînd un medicament, care nu acționează asupra moleculelor libere ale unei enzime, să influențeze activitatea enzimei respective atunci cînd aceasta este integrată în structura materiei vii. Se înțelege că un asemenea medicament va fi inactiv asupra enzimei *in vitro* dar *in vivo* va modifica comportarea catalitică a enzimei respective.

În fine, unele medicamente ar putea acționa atît asupra moleculelor unei enzime, cît și asupra aceleiași enzime integrate în structura materiei vii. Într-un asemenea caz, medicamentul influențează comportarea enzimei atît *in vitro* cît și *in vivo*, ultima acțiune fiind însă diferită de prima, deoarece enzima aflată în stare deformată în structura materiei vii va fi influențată de medicament altfel decît în stare liberă, nedeformată.

Toate acestea arată că rezultatele cercetărilor experimentale cu privire la acțiunea medicamentelor asupra enzimelor, efectuate *in vitro*, nu pot fi nicidecum generalizate și considerate ca valabile în condițiile unui organism viu.

Deducția a doua *privește procesul evolutiv continuu prin care trece atît structura materiei vii în ansamblu, cît și fiecare componentă a ei în parte.*

Interacțiunile dintre moleculele enzimei, devenite prin asimilație componente ale structurii materiei vii, și celelalte componente ale structurii acestei materii nu rămîn fixe, ci evoluează continuu. Prin urmare, repercusiunile acestor interacțiuni asupra enzimelor asimilate continuă să evolueze și ele mult timp și după asimilație. Procesul este complicat și se poate

desfăşura în cele mai diferite moduri, în funcţie de numeroşi factori capabili să-l influenţeze provocînd „deformări" diferite ale componentelor materiei vii. Din moment însă ce „deformările" la nivelul componentelor enzimatice ale structurii materiei vii pot evolua în mod diferit, înseamnă că activitatea lor catalitică nu rămîne nici ea mereu aceeaşi, ci se modifică în funcţie de starea şi modul de evoluţie a structurii materiei vii în care enzima respectivă s-a integrat.

În aceste împrejurări, se înţelege că răspunsul unei anumite componente enzimatice a materiei vii faţă de acţiunea unui medicament, şi, prin urmare, comportarea bolnavului faţă de medicamentul respectiv, poate varia atît din punct de vedere cantitativ, cît şi chiar calitativ, în funcţie de vîrsta bolnavului, specificul său ereditar, starea sa patologică, precum şi de alţi parametri, asupra cărora nu putem insista aici.

A treia deducţie *priveşte comportarea structurii materiei vii faţă de acţiunea diferiţilor agenţi externi şi interni, prin urmare şi faţă de medicamente.*

Din moment ce admitem că, datorită legăturilor corelative care se stabilesc între componentele materiei vii, structura acestei materii reprezintă o formaţie „unitară", un „întreg", înseamnă că modificările provocate de agenţii externi şi interni la nivelul unora dintre componentele acestei structuri se transmit altor componente şi se repercutează asupra întregii structuri. Mai mult: posibilităţile de modificare a componentelor unei astfel de structuri depind de specificul structurii însăşi şi sînt condiţionate de aceasta. De aceea, caracterul reacţiei structurii materiei vii la acţiuni externe şi interne depinde atît de starea componentelor ei, cît şi de starea structurii în ansamblul ei [8].

Cum în structura materiei vii pe lîngă alte componente sînt integrate şi diferite enzime, şi cum comportarea catalitică a acestor enzime poate varia atît cantitativ cît şi calitativ, în funcţie de starea lor (gradul de deformare, natura deformării, felul altor componente de care ele sînt legate prin legături corelative etc.), precum şi de starea întregii structuri în ansamblul ei, înseamnă că modificările provocate de un medicament la nivelul oricărei componente a structurii materiei vii se pot transmite altor componente, chiar foarte îndepărtate de locul de acţiune al medicamentului, provocînd modificări corespunzătoare ale stării şi activităţii componentelor catalitice.

Din punctul de vedere al relaţiilor dintre medicamente şi enzime, această deducţie prezintă un interes deosebit. În adevăr, ea ne arată că un medicament, chiar inactiv asupra enzimelor cuprinse în structura materiei vii, poate provoca modificări esenţiale de ordin cantitativ şi chiar calitativ ale activităţii lor catalitice acţionînd asupra uneia sau alteia dintre componentele neenzimatice ale materiei vii. O astfel de acţiune, provocată de medicamente, se poate propaga mai mult sau mai puţin repede de-a lungul întregii structuri a materiei vii şi se poate transmite la distanţe considerabile de la locul unde a acţionat medicamentul, modificînd în cele mai diferite feluri acţiunea numeroaselor şi variatelor componente enzimatice cuprinse în structura acestei materii. Este de remarcat că astfel de acţiuni profunde, multilaterale şi indirecte pot fi provocate de cantităţi minimale ale medicamentului, incomparabil mai mici decît cele

necesare provocării unei acțiuni directe asupra unei enzime aflate sub forma de molecule în materia nevie a protoplasmei. Asemenea mecanisme de acțiune pot fi luate în considerație pentru explicarea efectelor cîteodată extrem de puternice ale medicamentelor administrate în doze infinitezimale, ca de exemplu în homeopatie.

Tot în acest cadru poate fi examinată și problema activității medicamentelor în condițiile unui organism aflat sub acțiunea unor agenți capabili să modifice mai mult sau mai puțin reversibil comportarea materiei lui vii, cum sînt de exemplu stările anormale ale sistemului nervos, agenții patogeni, substanțele excitante etc. Dacă astfel de agenți provoacă modificări reversibile la nivelul materiei vii, înseamnă că sub acțiunea lor se modifică nu numai structura acestei materii, dar și starea componentelor ei și, prin urmare, comportarea catalitică a componentelor ei enzimatice. Rezultă că, în condițiile unui organism supus unor tratamente prealabile sau aflat într-o stare anormală, unul și același medicament, administrat în același mod și în aceeași doză, poate avea efecte diferite, în funcție de starea în care se află materia vie a organismului respectiv. Aici se încadrează explicațiile care se pot da stărilor alergice, influenței stărilor psihice asupra comportării bolnavilor față de medicamente, efectelor tratamentului prin șoc, prin acupunctură etc.

Deducția a patra *privește raporturile dintre materia vie și materia nevie, coexistente în protoplasmă.*

După cum am arătat la începutul acestei expuneri, protoplasma vie poate fi considerată — din punct de vedere al alcătuirii sale — ca un fel de burete în care sistemul spongios este format din materia vie, sistemul canalicular fiind ocupat de materia nevie [1], [2].

Este evident că reacțiile chimice care au loc între moleculele diferitelor substanțe ale materiei nevii din sistemul canalicular se produc conform legilor chimice. De altfel, aceste reacții pot fi reproduse și în afara protoplasmei, *in vitro*. Totalitatea lor în celulă poate fi considerată ca alcătuind biochimismul celular.

Este însă probabil că și la nivelul componentelor structurii materiei vii din care este alcătuită partea spongioasă a protoplasmei se desfășoară diferite transformări. Dar, asemenea transformări, deși echivalente în fond cu reacțiile chimice obișnuite, se deosebesc totuși de acestea, deoarece se produc în condițiile unei structuri cu totul speciale, profund deosebită de aceea a materiei nevii. De aceea, asimilația — adică integrarea moleculelor diferitelor substanțe în structura materiei vii, dezasimilația — adică individualizarea și ieșirea moleculelor diferitelor substanțe din structura acestei materii, precum și transformările de ordin chimic care se produc la nivelul materiei vii, deși se produc conform legilor chimice, se deosebesc calitativ de fenomenele chimice obișnuite iar ansamblul lor poate fi considerat ca alcătuind metabolismul celular [1], [2].

Dată fiind între pătrunderea și interdependența celor două feluri de materie care alcătuiesc protoplasma, între fenomenele de ordin chimic care se produc în ele se realizează o anumită corelație. Reacțiile chimice dintre substanțele din sistemul canalicular pot provoca anumite transfor-

mări în regiuni învecinate ale masei spongioase alcătuite din materia vie, cu repercusiuni asupra însușirilor și stărilor componentelor acestei materii, și invers : diferitele transformări și schimbări ce se produc într-o porțiune a materiei vii se pot repercuta asupra naturii, vitezei și sensului reacțiilor chimice care se produc în materia nevie aflată în sistemul canalicular din imediata vecinătate [1], [2].

Pentru problema relațiilor dintre medicamente și enzime, aceste considerații prezintă interes fiindcă, în principiu, ne permit să intuim unele aspecte atît ale circulației intracelulare a medicamentelor, precum și ale posibilităților de interacțiune a acestora cu enzimele aflate sub formă de molecule în materia nevie a protoplasmei.

Circulația intercelulară a medicamentelor se poate prezenta sub aspecte variate.

Unele medicamente pot pătrunde și trece prin sistemul canalicular al protoplasmei fără să intre în vreo interacțiune directă cu materia vie. Aici, în materia nevie a sistemului canalicular, medicamentele pot întîlni moleculele enzimelor asupra cărora acționează direct, modificînd activitatea enzimatică a acestora cam în același mod cum o modifică în condițiile cercetărilor efectuate *in vitro*. Astfel de acțiuni se pot repercuta însă asupra stării și comportării materiei vii coexistente, determinînd efecte mai mult sau mai puțin puternice asupra metabolismului celular.

Alte medicamente, pătrunse în sistemul canalicular, pot acționa direct fie asupra componentelor enzimatice, fie asupra componentelor neenzimatice ale structurii materiei vii, aflate la suprafața de contact a acesteia cu materia nevie. Efectele care se produc în asemenea împrejurări au fost deja analizate și nu revenim asupra lor.

În fine, nu este exclus nici cazul medicamentelor care se pot integra în însăși structura materiei vii, devenind componente „anormale" ale acesteia. Desigur, moleculele unor astfel de medicamente trebuie să aibă anumite însușiri asemănătoare cu ale acelor substanțe care, în mod natural, prin asimilație, devin componente ale materiei vii. Odată integrate în structura acestei materii, medicamentele respective pot exercita în partea spongioasă a protoplasmei anumite funcții biologice și pot participa la anumite mecanisme ale proceselor elementare ale vieții din materia vie. Cum însă astfel de componente „medicamentoase" se deosebesc de componentele „normale" ale materiei vii, prezența lor în structura acestei materii nu poate rămîne fără urmări asupra desfășurării atît a metabolismului cît și a biochimismului din organismul respectiv.

Mai este de remarcat că în asemenea împrejurări, acțiunea medicamentului devenit component al structurii materiei vii poate fi de lungă durată, pînă la dezasimilația componentelor „medicamentoase", adică pînă la eliminarea lor din structura menționată.

Ultima, și anume cea de a **cincea deducție**, pe care o vom lua în considerație în această lucrare, *se referă la legitatea fenomenelor care se produc în materia vie.*

Deși problema aceasta este de cea mai mare importanță pentru lămurirea condițiilor în care se desfășoară relațiile dintre medicamente

și enzime într-un organism viu, ne vom opri aici numai asupra unui singur aspect al acestei probleme, și anume asupra aspectului ei cibernetic.

Este evident că structura materiei vii cuprinde anumite configurații ale componentelor ei care stau la baza mecanismelor de autoreglare și control, fără de care existența materiei vii este de neconceput. Or, manifestarea fenomenelor de reglare la nivelul mecanismelor menționate urmează legi cibernetice [5] — [8]. Înseamnă că întreg ansamblul de relații multilaterale între medicamente și diferitele forme de existență ale enzimelor (enzime moleculare din materia nevie a protoplasmei, componente enzimatice ale materiei vii aflate în cele mai diferite stări funcționale), precum și relațiile dintre fenomenele biochimico-biologice de natură diferită care se produc sub acțiunea medicamentelor în cele două feluri de materie ale protoplasmei, se desfășoară în prezența mecanismelor de reglare care tind să mențină activitatea metabolică normală a organismului, respectiv s-o readucă la normal cînd ea este tulburată sub influența factorilor generatori ai stărilor patologice. Aceasta face ca dintre diferitele acțiuni posibile ale medicamentelor asupra enzimelor organismului viu, mai probabile să fie acelea care se pot încadra în ritmul proceselor cibernetice care se produc în organism. De aceea, stabilirea relațiilor dintre medicamente și enzime în organismul viu necesită cunoașterea legității fenomenelor cibernetice și biologice care se produc la nivelul materiei vii și prezintă un interes deosebit. Totodată este important ca durata și intensitatea acțiunii medicamentului să nu depășească limitele compatibile cu menținerea reversibilității modificărilor structurale ale materiei vii.

Acțiunile prea intense și de prea lungă durată ale medicamentelor pot duce la modificări nereversibile ale structurii materiei vii. Dacă o astfel de modificare nu împiedică existența structurii acestei materii, atunci protoplasma continuă să trăiască, prezentînd însă însușiri și comportări noi, deosebite de ale protoplasmei inițiale și corespunzătoare noilor aspecte ale structurii materiei sale vii. Dacă însă modificarea nereversibilă a structurii materiei vii, provocată de medicament, este atît de însemnată încît integritatea acestei structuri nu se mai poate menține, atunci începe desfășurarea acelor procese care duc la destrămarea structurii materiei vii și, prin aceasta, la moartea protoplasmei.

Din cele expuse rezultă că concepția despre coexistența în protoplasma vie a două feluri de materie cu structuri și însușiri diferite : materia vie și materie nevie, permite intuirea unei serii de raporturi diferite între medicamente și enzime. Considerăm că această concepție poate servi ca ipoteză de lucru pentru noi cercetări în domeniul biochimiei și farmacologiei medicamentelor.

Prezentată la redacție
la 15 noiembrie 1965

Institutul de biochimie al Academiei Republicii Socialiste România
și
Catedra de biochimie a Universității București

BIBLIOGRAFIE

1. E. Macovschi, *Materia vie şi geneza ei*, în *Culegere de studii*: *„Materialismul dialectic şi ştiinţele contemporane ale naturii"*, Edit. politică, Bucureşti, 1959, p. 155.
2. — *Die lebende Materie und ihre Entstehung*, Revue de Chimie, **IV**, *1*, 11 (1959).
3. — *Materia vie şi rolul ei în hibridarea plantelor*. St. cerc. biochim., **6**, 467 (1963).
4. — *Einige neue Anschauungen über die Natur der lebenden Materie in Beziehung zur Biochemie des Krebses*, Vitalstoffe und Zivilisationskrankheiten, **VIII**, *2(34)*, 48 (1963).
5. — *La structure de la matière vivante et quelques aspects cybernetiques de ce probleme. (Note préliminaire)*, Vitalstoffe und Zivilisationskrankheiten, **IX**, *2(40)*, 39 (1964).
6. — *Unele aspecte cibernetice în problema structurii materiei vii*, St. cerc. biochim., **7**, 5 (1964). *Nekotorie aspekti kibernetiki i struktura jivoi materii*, Rev. roum. Biochim., **1**, 5 (1964).
7. — *Kybernetik im Organismischen*, Vitalstoffe und Zivilisationskrankheiten, **IX**, *3(41)*, 89 (1964).
8. — *Unele probleme ale mecanismelor de reglare şi ale structurii materiei vii*, St. cerc. biochim., **8**, 253 (1965). *Some problems of regulation mechanisms and of living matter structure*, Rev. roum. Biochim., **2**, 189 (1965).
9. — *Materia vie şi distribuţia asimetrică a electroliţilor între protoplasmă şi lichidul interstiţial (Bazele teoriei structurii şi comparaţia lor cu bazele teoriilor membranei şi sorbţiei)*, St. cerc. biochim., **8**, 371 (1965).

ST. CERC. BIOCHIM., 9, 1, 11–19 (1966)

CONTRIBUȚII LA STUDIUL BIOCHIMIEI REZISTENȚEI LA GER A CEREALELOR DE TOAMNĂ

NOTA III. STUDIUL COMPARATIV AL ACTIVITĂȚII PEROXIDAZEI LA CEREALE DE TOAMNĂ ÎN TIMPUL IERNII

I. BRAD

577.16:633.1

Rezumat. — Se expun rezultatele obținute la determinarea activității peroxidazei prin metoda cu pirocatehină la cereale diferite (secară, grîu și orz) și la plante de orz însămînțate pe teren îngrășat diferențiat. S-a analizat separat activitatea peroxidazei din nodul cu hipocotil și din frunză. Activitatea peroxidazei în nodul cu hipocotil, organ mai rezistent la ger, este mai mare decît în frunză la toate variantele analizate. La același organ (frunză sau nod) se constată că la specia cea mai puțin rezistentă (orzul) activitatea peroxidazei este mai mare. Totuși nu se poate deduce că determinarea activității peroxidazei poate constitui un indice sigur de apreciere a rezistenței. Azotatul de amoniu determină, în general, o mărire a intensității activității peroxidazei, exceptînd perioada cu temperaturile cele mai scăzute din timpul iernii, cînd superfosfatul și sarea potasică determină o activitate mai mare a peroxidazei. Azotatul de amoniu determină și o acumulare mai mare de substanțe aromatice extractibile cu apă.

Anterior [3], [4] au fost publicate note referitoare la relația dintre conținutul de vitamină C, activitatea catalazei și rezistența la ger a cerealelor de toamnă. În lucrarea de față sînt prezentate rezultatele obținute la determinarea activității peroxidazei pentru aceleași variante, mai puțin soiurile de grîu.

În materialul bibliografic referitor la activitatea peroxidazei legată de influența temperaturilor scăzute asupra plantelor și de rezistența acestora la ger, am prezentat lucrări care au fost publicate atît înainte de începerea cercetărilor prezentate în această notă, cît și ulterior. Aceste lucrări scot în evidență caracterul contradictoriu al constatărilor făcute de diferiți cercetători. De asemenea se constată că activitatea acestei enzime și conținutul în substanțe oxidate prin activitatea ei sînt foarte puțin studiate.

Referitor la activitatea peroxidazei, Levitt [15] arată că Doyle și Clinch constată o legătură directă între activitatea peroxidazei și rezistența la ger la frunzele de conifere. Aceeași corelație este constatată și de Saakian [25], [26] la mai multe soiuri de viță de vie, de Kușnirenko [14] la semin-

ţele germinate de porumb şi de tomate călite, faţă de cele necălite, şi de Bassarskaia la grîul de toamnă, faţă de cel de primăvară [1]. Alţi autori constată o corelaţie inversă între rezistenţa la ger şi activitatea peroxidazei, ca de exemplu Kokin şi Vîlkova [12] la mai multe soiuri de măr, Mazaiev [18] tot la soiuri şi hibrizi de măr, iar Brad, Laszlo şi Valuţă [8] la soiuri de orz. Proţenko şi Bogomaz [23], [24] analizînd activitatea peroxidazei în scoarţa şi în lemnul de măr şi constată că, după activitatea peroxidazei din lemn, valoarea cea mai mare corespunde soiului celui mai rezistent. Această constatare nu mai este valabilă pentru activitatea peroxidazei din scoarţă. Polușciuk [22] constată o creştere a activităţii peroxidazei în timpul iernii în scoarţa de măr. Milică, Pîrjol, Juncu, Brad şi Hurduc [20] constată o scădere a activităţii peroxidazei o dată cu scăderea temperaturii, scăderea cea mai mare constatîndu-se la soiurile de grîu cele mai rezistente. Aksenova [21] observă la grîul de toamnă un sens contrar al activităţii peroxidazei şi polifenoloxidazei şi o creştere puternică a activităţii peroxidazei după călirea grîului de toamnă. Marinciuk şi Kurbatova [16] constată la trifoi o activitate mai mare a polifenoloxidazei la soiul mai rezistent, dar activităţi egale ale peroxidazei.

Referitor la influenţa nutriţiei minerale asupra rezistenţei la ger, numeroase indicaţii din literatură arată că fosforul şi potasiul favorizează rezistenţa la ger, în timp ce azotul o micşorează, mai ales atunci cînd este dat în cantităţi mari (15). Literatura nu conţine date în legătură cu influenţa nutriţiei minerale asupra activităţii peroxidazei.

Rezultatele prezentate de noi fac parte dintr-un ansamblu de cercetări executate între 1958 şi 1962. În lucrările anterioare [3], [4] a fost prezentat modul de montare a experienţelor şi s-a arătat de asemenea ansamblul de indici analizaţi. Rezultatele obţinute vor fi prezentate în mai multe note [5], [6], [7].

Prin cercetările executate s-a urmărit să se găsească indici cît mai siguri pentru trierea plantelor după rezistenţă, să se acumuleze o sumă de date care să contribuie la stabilirea bazelor biochimice ale procesului de supravieţuire a plantelor, să se contribuie la depistarea în mare a punctelor, a secvenţelor din metabolism unde este necesar să se intervină, ca şi a sensului în care unele procese trebuie să se desfăşoare pentru ca metabolismul plantei să favorizeze rezistenţa la ger.

Contribuţia acestei lucrări la elucidarea problemelor de biochimie a rezistenţei la ger constă în aceea că un studiu asemănător cu cel executat de noi nu a fost încă realizat. Cercetările noastre completează materialul faptic referitor la acest subiect, permiţînd formularea concluziilor corespunzătoare în ansamblul determinărilor executate.

MATERIAL ŞI METODE

Pentru efectuarea studiului comparativ între specii au fost alese secara din soiul Petkus, foarte rezistentă la ger, grîul din soiul A 15, cu rezistenţă medie la ger, şi orzul Cenad 396 (C-396), mai puţin rezistent la ger.

La efectuarea studiului comparativ al activității peroxidazei în funcție de nutriția minerală, cu efect pozitiv sau negativ asupra rezistenței la ger, s-a lucrat cu orzul C-396. Au fost comparate 6 variante, prezentate detaliat în lucrarea anterioară (3), împreună cu modul de recoltare și pregătire a probelor.

Pentru determinarea peroxidazei s-a utilizat metoda Mihlin și Bronovițkaia [9] cu pirocatehină. Frunza sau nodul cu hipocotil au fost mojarate și aduse la un volum de 20 de ori mai mare decît greutatea în grame, cu soluție tampon acid acetic-acetat, pH 4,5. Determinările au fost făcute la 20°C. S-a lucrat cu 1 ml de extract clar, 1 ml de soluție 0,22% pirocatehină, 1 ml de soluție 0,4% apă oxigenată, 2 ml de soluție 0,1% acid ascorbic. Blocarea s-a făcut cu 2 ml de soluție 15% acid metafosforic, iar titrarea s-a făcut cu soluție 0,02 n I_2 în prezență de 1 ml de soluție 1% amidon. Martorul analizei constă din proba fără adaos de apă oxigenată, volumul acesteia fiind înlocuit cu 1 ml de apă distilată. Activitatea peroxidazei a fost exprimată în mg de acid ascorbic oxidat în 2 min la 20°C și pH 4,5 de extractul obținut din 100 g de substanță verde.

Subliniem faptul că probele au fost recoltate după perioade de timp cu variații mari de temperatură și cît mai aproape de maximele și minimele de temperatură ale perioadei respective. În nota I [3] au fost prezentate curbele cu temperaturile maxime și minime, precum și, precipitațiile din anii 1958—1961.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Analiza comparativă a rezultatelor activității peroxidazei din nodul cu hipocotil și din frunză scoate în evidență foarte mari deosebiri în ce privește activitatea peroxidazei din cele două organe (tabelele 1 și 2). La intrarea în iarnă, această activitate este mult mai mare la nodul cu hipocotil decît la frunză, la toate variantele. La secară și la orz, activitatea continuă să fie, în perioada de iarnă, mai mare la nodul cu hipocotil decît la frunză. La grîu, activitatea peroxidazei devine mai mică în nod decît în frunză în toată perioada de iarnă, fără nici o excepție. Sînt de adăugat două fapte importante la această constatare : situația inversată a conținutului de vitamină C față de activitatea peroxidazei [3] și situația inversată între nod și frunză a activității catalazei [4], față de activitatea peroxidazei, cu exceptarea grîului.

Din aceste date se poate deduce că activitatea crescută a peroxidazei din nod este unul dintre factorii favorabili rezistenței, prin utilizarea la maximum a energiei și oxigenului din H_2O_2. Prin metabolizarea apei oxigenate cu ajutorul peroxidazei, în nodul cu hipocotil pierderile de oxigen și de energie se reduc față de cazul cînd descompunerea apei oxigenate se face de către catalază. Nu înseamnă însă că activitatea *in vivo* este mai mare, deoarece, conținutul în substanțe reducătoare este mai mare în nodul cu hipocotil [5] ceea ce trădează o stare de latență mai avansată. În consecință, și cantitatea de H_2O_2 ce se poate forma este mai mică. Datorită însă unei activități peroxidazice mari, este posibilă folosirea celor mai mici cantități de H_2O_2, fără pericolul de pierderi datorite activității catalazei. De aceea sîntem înclinați să credem că este vorba numai de o capacitate peroxidazică mare.

Dat fiind faptul că extractul apos din frunză este mai colorat, datorită substanţelor aromatice existente [5], [11], [17], [27], [28], în comparaţie cu extractul apos din nodul cu hipocotil care este, practic incolor, se poate conchide că oxigenul din H_2O_2 este folosit în frunză în bună măsură pentru oxidarea acestor produşi. În contrast cu aceasta, în nodul cu hipocotil se pare că prin activitatea peroxidazei se realizează în mod deosebit inhibarea activităţii invertazei şi a unor enzime proteolitice [17], [19], deoarece în acest organ spre deosebire de frunză, cantitatea de zahăr total este mai mare, iar conţinutul de aminoacizi liberi este mai mic [5], [6] la toate plantele analizate de noi.

Rezultă deci că o activitate peroxidazică mare, asociată cu un conţinut mare de zahăr total, un conţinut mic de aminoacizi liberi şi un conţinut mic de substanţe aromatice — cum se constată la nodul cu hipocotil — constituie un ansamblu metabolic favorabil rezistenţei la ger.

Analizînd comparativ rezultatele activităţii peroxidazei la cele trei specii : secară, grîu şi orz, se constată fără nici o excepţie că activitatea peroxidazei este mult mai mare la frunza de orz, mai mică la frunza de grîu şi este cea mai mică la frunza de secară, diferenţele între rezultatele obţinute la cele trei specii fiind chiar foarte mari (tabela 1). Considerăm interesant de subliniat că extractul apos din frunza de orz este intens colorat în galben-brun, cel de grîu este colorat în galben, iar cel de secară este foarte slab gălbui. Diferenţa în intensitatea de coloraţie a extractelor este tot atît de mare ca şi diferenţa în ce priveşte activitatea peroxidazei la cele trei specii. În nodul cu hipocotil, activitatea peroxidazei este maximă la orz, minimă la grîu, la secară avînd valori intermediare, mai apropiate însă de valorile constatate la grîu.

Din aceste date ar rezulta că o activitate peroxidazică mare este legată de o rezistenţă mai slabă la ger. Ţinînd seama de faptul că în afară de un conţinut mai mare de substanţe aromatice, orzul are şi un conţinut mai mic de vitamină C [3], un conţinut mai mic de zahăr direct reducător şi total [5], un conţinut mai mare de aminoacizi liberi [6] şi o activitate catalazică mare [4], activitatea peroxidazică mai mare indică un metabolism mai intens. Deducem de aici că prin activitatea peroxidazei la orz rezultă îndeosebi o cantitate mare de substanţe aromatice oxidate şi este mai puţin inhibată activitatea invertazei sau a enzimelor proteolitice.

Referindu-ne la activitatea peroxidazei ca test pentru trierea plantelor după rezistenţă, ajunge la concluzia că la cerealele de toamnă activitatea peroxidazei este mai mică la plantele mai rezistente, chiar dacă ordonarea după acest test nu este strictă. Rămînem de asemenea cu convingerea că este bine să se ia drept criteriu de ordonare după rezistenţă, cu mai multe şanse de a nu greşi, activitatea peroxidazei din frunză, deoarece acest organ este mai vulnerabil, fiind mai sensibil la ger şi în acelaşi timp mai expus. Oricum însă, mai ales atunci cînd există dubii, interpretarea trebuie făcută ţinîndu-se seama atît de rezultatele activităţii altor enzime cît şi de conţinutul diferitelor substanţe corelate metabolic.

Luînd în consideraţie variaţia activităţii peroxidazei în funcţie de variaţia temperaturii mediului de dezvoltare al plantelor, este de remarcat că pe măsură ce se înaintează în iarnă, începînd chiar din decembrie,

activitatea peroxidazei scade. Ulterior se constată că atît în nod, cît și în frunză activitatea peroxidazei crește o dată cu scăderea puternică a temperaturii. De exemplu, la 19. II. 1959, 20. II. 1960 și 8. II. 1961 (tabelele 1 și 2) activitatea crește față de cele constatate la 8. I. 1959, 20. I. 1960 și 11. I. 1961 (tabelele 1 și 2), date la care temperaturile au fost mai puțin scăzute. Acest mers indică reactivarea peroxidazei, provocată de temperatura scăzută. În aceeași perioadă de timp activitatea peroxidazei este favorizată și de o creștere a acidității totale titrabile [7] prin care se realizează un pH mai apropiat de pH-ul optim al peroxidazei, situat în jurul valorii 5.

Este interesant de subliniat că în această perioadă constatăm și o creștere a raportului zahăr total/zahăr direct reducător [5], atît în noduri cît și în frunze, la toate variantele, fapt care poate fi interpretat ca o nouă

Tabela 1

Variația activității peroxidazei din nodul cu hipocotil (*n*) și frunza (*f*) de secară, grîu și orz exprimată în mg de acid ascorbic oxidat în 2 min lar 20° C și pH 4.5 de extractul din 100 g de substanță verde în sistem tampon acid acetic — acetat de sodiu (1958—1961)

Varianta \ Data	1.XII 1958	15.XII 1958	8. I. 1959	19. II. 1959	3. III. 1959	25 III. 1959	7. IV. 1959	8. V. 1959	12. V. 1959	22. V. 1959	10 .VI. 1959
Secară (*n*)	3285	4880	818	1692	4628	1242					
Grîu (*n*)	2596	2590	316	900	1568	1157	faza de împăiere				
Orz (*n*)	5504	7884	4740	8190	17732	2306					
Secară (*f*)	724	1294	482	918	1602	790	730	464	199	144	618
Grîu (*f*)	1410	1427	594	1368	1926	1108	696	298	348	126	172
Orz (*f*)	1737	2688	2156	8010	7654	4716	1260	514	134	180	104

Varianta \ Data	12. XII. 1959	26.XII 1959	20. I. 1960	20. II. 1960	23. III. 1960	14. IV. 1960	29. IV. 1960	16. VI. 1960	2. VII. 1960
Secară (*n*)	782	922	1110	1218	730	528	faza de împăiere		
Grîu (*n*)	850	843	850	1136	373	334			
Orz (*n*)	3846	4182	4270	6120	1655	1355			
Secară (*f*)	544	911	629	1218	249	141	72	32	46
Grîu (*f*)	612	1376	1110	1374	609	106	330	132	191
Orz (*f*)	1785	1382	2072	2792	874	264	189	49	139

Varianta \ Data	20.XII 1960	11. I. 1961	26. I. 1961	8. II. 1961	22. II. 1961	15. III. 1961	7. IV. 1961	9. V. 1961	16. VI. 1961
Secară (*n*)	2329	2519	1366	1676	2874	2234	2394	faza de împăiere	
Grîu (*n*)	2985	2197	907	947	2256	1192	1935		
Orz (*n*)	10360	6625	3947	6457	3531	3528	2197		
Secară (*f*)	1213	2017	777	1646	874	470	557	998	962
Grîu (*f*)	2314	2837	1668	2174	3255	2184	1510	1418	1022
Orz (*f*)	2870	2181	2316	2622	2203	1948	754	594	332

confirmare a inhibării activității invertazei de către peroxidază, în anumite condiții [17], [19].

Nu trebuie să uităm însă că determinările au fost executate la 20°C și, ca atare, nu înseamnă că în plantă în condițiile din cîmp, activitatea peroxidazei este mai mare față de datele anterioare. Prin reactivarea peroxidazei și prin micșorarea pH-ului, care favorizează activitatea peroxidazei, se poate compensa în destul de mare măsură scăderea activității reale provocate de temperaturile scăzute din cîmp. Deoarece în același timp activitatea catalazei scade în cele mai multe cazuri [4], fenomen accentuat și prin îndepărtarea de pH-ul optim, situat în jur de valoarea 7, ajungem la concluzia că apa oxigenată este metabolizată mult mai avantajos prin sistemul peroxidazic.

Trecînd la influența îngrășămintelor minerale asupra activității peroxidazei, din tabelele 2 și 3 se observă că azotatul de amoniu determină

Tabela 2

Variația activității peroxidazei în nodul cu hipocotil (*n*) și frunza (*f*) de orz însămînțat pe teren neîngrășat sau îngrășat cu N P K în diferite proporții, exprimată în mg de acid ascorbic oxidat în 2 min la 20°C și pH 4,5 de extractul din 100 g de substanță verde în sistem tampon acid acetic-acetat de sodiu (1960—1961)

Varianta \ Data	20.XII 1960	11. I. 1961	26. I. 1961	8. II. 1961	22. II. 1961	16. III. 1961	7. IV. 1961	9. V. 1961	16. VI. 1961
orz $N_0P_0K_0$ n	10360	6625	3947	6457	3531	3528	2197		
orz $N_1P_1K_1$ n	10200	7502	3172	5411	4827	4334	2230	faza de	
orz $N_3P_1K_1$ n	13152	6150	5848	6357	6868	3124	1935	împăiere	
orz $N_1P_3K_1$ n	10540	6478	3693	5743	5086	3099	2460		
orz $N_1P_1K_3$ n	11611	6330	3714	5826	6496	3130	2230		
orz $N_3P_3K_3$ n	14202	5986	6188	6274	5508	3427	2164		
orz $N_0P_0K_0$ f	2870	2181	2316	2622	2203	1948	754	594	332
orz $N_1P_1K_1$ f	2509	2525	1684	2788	2916	1713	1902	620	544
orz $N_3P_1K_1$ f	2361	3952	1996	2141	2997	1873	852	822	1692
orz $N_1P_3K_1$ f	1869	3165	4260	2656	3823	1344	393	480	232
orz $N_1P_1K_3$ f	1193	4247	4754	2476	5202	1411	492	446	298
orz $N_3P_3K_3$ f	3132	3214	3256	3387	5346	1041	721	894	2324

Tabela 3

Variația activității peroxidazei din frunza de orz însămînțat pe teren neîngrășat sau îngrășat cu N P K în diferite proporții, exprimată în mg de acid ascorbic oxidat în 2 min la 20°C și pH 4,5 de extractul din 100 g de substanță verde în sistem tampon acid acetic-acetat de sodiu (1959, 1960)

Varianta \ Data	25. III 1959	7. IV. 1959	8. V. 1959	12. V. 1959	22. V. 1959	10. VI. 1959	29. IV. 1960	16. V. 1960	2. VI. 1960
orz $N_0P_0K_0$	4716	1260	514	134	180	104	189	49	139
orz $N_1P_1K_1$	—	—	—	—	—	—	174	160	174
orz $N_3P_1K_1$	5796	2140	664	431	180	364	352	166	278
orz $N_1P_3K_1$	3852	1344	166	166	108	98	103	25	126
orz $N_1P_1K_3$	2916	2058	199	166	108	98	103	19	121
orz $N_3P_3K_3$	—	—	—	—	—	—	164	149	400

o activitate mult mai mare a peroxidazei, spre deosebire de superfosfat și de sarea potasică, care micșorează activitatea în raport cu martorul. Între varianta cu azotat de amoniu și cele cu superfosfat și sare potasică sînt diferențe foarte mari. La începutul perioadei de temperaturi scăzute (26. I. 1965, tabela 2), superfosfatul și sarea potasică determină o puternică scădere a activității peroxidazei în nodul cu hipocotil, urmată la 8. II. 1961 de o creștere relativ mai mare față de alte variante. La aceeași dată, activitatea peroxidazei la variantele $N_1P_3K_1$ și $N_1P_1K_3$ rămîne însă mai mică decît la variantele $N_3P_1K_1$ și $N_3P_3K_3$. În frunză, în perioada 26. I, 8. II și 22.II. 1961, la variantele $N_1P_1K_3$ și $N_1P_3K_1$ activitatea peroxidazei este mai mare decît la varianta $N_3P_1K_1$.

Rezultatele obținute demonstrează că îngrășămintele fosfatice și potasice favorizează instalarea mai rapidă a stării de latență la plante, reactivarea mult mai puternică a peroxidazei în perioadele cu temperaturi scăzute. Azotatul de amoniu determină o creștere a activității peroxidazei, întîrzie instalarea stării de latență, nu permite o reactivare puternică a peroxidazei la scăderea temperaturii și creează condiții nefavorabile pentru protecție. Aceste constatări sînt întărite și de rezultatele obținute la determinarea altor indici [3 — 8].

În ceea ce privește conținutul de substanțe aromatice extractibile cu apă, menționăm că extractul apos la varianta $N_3P_1K_1$ este brun-închis și se deschide la culoare în ordinea $N_3P_3K_3 > N_1P_1K_1 > N_0P_0K_0 > N_1P_3K_1 > N_1P_1K_3$. La această ultimă variantă, culoarea extractului apos este apropiată de culoarea extractului apos din grîu.

Problema activității peroxidazei și a substanțelor aromatice implică aspecte mult mai complicate. Această complexitate este evidențiată și de unele constatări făcute de noi în ceea ce privește diferențele dintre spectrul și cantitatea substanțelor aromatice separate cromatografic după extracția cu alcool 80%, față de extracția cu apă [5], [6], la diferitele variante analizate. Aceste aspecte vor fi luate în discuție în notele viitoare [5 — 7].

Prin extinderea considerentelor din lucrarea referitoare la catalază (4) și ținînd seama și de cele constatate în lucrarea de față, trebuie subliniat că aprecierea rezistenței după activitatea unei enzime trebuie să fie făcută ținîndu-se seama simultan de variațiile în funcție de temperatură și de intensitatea creșterilor sau scăderilor de activitate. De asemenea determinarea coeficientului van't Hoff trebuie extinsă și la peroxidază, ca și determinarea la temperaturi apropiate de 0°C, ca în cazul catalazei.

O reală interpretare și înțelegere a mecanismului rezistenței, cu implicarea peroxidazei și folosirea cu bune rezultate, ca test de triere, a activității peroxidazei, necesită luarea în considerație și a conținutului diferitelor substraturi, în special, pentru cazul în speță, a conținutului în substanțe aromatice.

CONCLUZII

1. Activitatea peroxidazică, determinată prin metoda cu pirocatehină, este mai mare în timpul iernii în nodul cu hipocotil decît în frunză la secară şi orz şi este mai mică în nodul cu hipocotil decît în frunză la grîu.

2. Activitatea peroxidazei determinată prin metoda cu pirocatehină este maximă în timpul iernii la frunza de orz, mai mică la frunza de grîu şi minimă la frunza de secară. În nodul cu hipocotil, activitatea peroxidazei este maximă la orz şi minimă la grîu.

3. Azotatul de amoniu determină în nodul cu hipocotil la orz o activitate mai mare a peroxidazei decît superfosfatul şi sarea potasică. În frunza de orz, superfosfatul şi sarea potasică determină o activitate mai mare în timpul perioadelor cu temperaturile cele mai scăzute din timpul iernii. Azotatul de amoniu provoacă o scădere a activităţii peroxidazei în aceeaşi perioadă şi determină de asemenea acumularea de cantităţi mari de substanţe aromatice extractibile cu apă.

4. Activitatea peroxidazei atît la nodul cu hipocotil cît şi în frunză, creşte o dată cu scăderea temperaturii în timpul iernii, după o scădere a activităţii faţă de valoarea de la intrarea în iarnă, prin aceasta realizîndu-se utilizarea cu randament mai mare a oxigenului şi a energiei din H_2O_2.

5. Din analiza comparativă a rezultatelor obţinute la aceleaşi organe ale diferitelor specii rezultă că la cereale activitatea peroxidazei este mai mare la specia mai puţin rezistentă. Totuşi testul activităţii peroxidazei nu poate constitui el singur un indice categoric de triere.

Prezentat la redacţie la
22 iulie 1965

Secţia de fiziologie şi biochimie vegetală,
I.C.C.P.T., Fundulea-Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. Bassarskaia M. B., Petrova M. P., Bogdanniuk A. S., Bogatkaia, M. A., *K voprosu ob aktivnosti peroksidazi v suhih semenah ozimoi i iarovoi pşeniţi*, Trud. Odesk. sh. hoz, inst., **16**, 109 (1959).
2. Bodea Cornel, *Tratat de biochimie vegetală*, Edit. Acad. R.P.R., Bucureşti, 1964.
3. Brad I., *Contribuţii la studiul biochimiei rezistenţei la ger a cerealelor de toamnă. Nota I. Studiu comparativ al conţinutului de vitamină C la cereale de toamnă în timpul iernii*, St. cerc. biochimie, an. VIII, *2* (1965).
4. Brad I., *Studiu comparativ al activităţii catalazei la cereale de toamnă în timpul iernii. Nota II.* St. cerc. biochimie, an. VIII, *3* (1965).
5. Brad I., *Studiu comparativ al conţinutului de zahăr direct reducător şi total la cereale de toamnă în timpul iernii . Nota IV* (în manuscris).
6. Brad I., *Studiu comparativ al conţinutului de proteină brută (azot total) la cereale de toamnă în timpul iernii. Diferenţieri ale conţinutului de aminoacizi liberi. Nota V*, (în manuscris).
7. Brad I., *Variaţia aciditătii totale titrabile la cereale de toamnă în timpul iernii. Nota VI*, (în manuscris).
8. Brad I., Laszlo Iulia, Valuţă Gh., *Studii fiziologice şi biochimice asupra comportării unor soiuri de orz în condiţii de iernare*, Analele ICAR, **XXVII**, Seria C, *35* (1959).

9. Ermakov A. I., Arasimovici V. V., Smirnova-Ikonikova M. I., Muri I. K., *Metodi biohimiciskova-issledovania rastenii*, Moscova-Leningrad, 1952.
10. Grommek R., Markakis P., *The effect of peroxidase on antocianin pigments*, J. Food Sci., **29**, *1*, 53 (1964).
11. Hais I. M., Macek K., *Cromatografia pe hîrtie*, trad. din limba cehă, Edit. tehnică, București, 1960.
12. Kokin A. Ie., Vîlcova-Malîșeva A. G. *Nekotorie dannie k biohimiceskoi harateristike morozoustoicivosti razlicinîh sortov iablon*, Biohimia plodov i ovoșcei, **3**, 90 (1955).
13. Kretovici V. L., *Bazele biochimiei plantelor*, Academia R.P.R., I.S.R.S., București, 1960.
14. Kușnirenko A. F., *Fiziologiceskie osobennasti tomatov i kukuruzi zakalenîh k holodu peremenîmi temperaturami*, Fiz. rast. **5**, *3*, 35 (1958).
15. Levitt J., *The hardiness of plants*, New York, 1960.
16. Marinciuk A. F., Kurbatova A. T., *Dîhanie i okislitelniie fermenti u zimostoikogo i maloustoicivogo sortov klevera*, *Fiziologhiia ustoicivosti rastenii*, Izd. A. N. SSSR, Moscova, 1960, 136.
17. Masov H. S., *Mechanism of oxigen metabolism*, Advances in enzimology, **19**, 70 (1957).
18. Mazaev V. P., *Activitatea peroxidazei la diferite soiuri și hibrizi de măr în legătură cu rezistența lor la ger*. Rev. ref. biol., *11* (1962) din Naucinie dokladî vîșșei școli biologhiceskaia nauki, *3*, 150 (1962).
19. Mirbäck Karl, *Invertases. The enzymes*, ed. a 2-a, *4*, 1960, p. 379.
20. Milică C. I., Pîrjol Liana, Juncu Ana-Maria, Brad I., Hurduc N., *Cercetări fiziologice și biochimice asupra rezistenței la ger a unor soiuri de grîu de toamnă*, Anal. I.C.C.P.T., **31**, seria C (1964).
21. Okunțov M. M., Aksenova O. F., *Osobennoste povedenie dîhatelnoi sistemî pri zakalivannii rastenii*. *Fiziologhiia ustoicivosti rastenii*, Izd. A. N. SSSR, Moscova, 1960, 113.
22. Polușciuk L. K., *Zavisimost zimostoikosti grețkogo oreha ot pogodnîh uslovii goda*. *Fiziologhiia ustoicivosti rastenii*, Moscova, 1960, 366.
23. Proțenko D. F., Bogomaz E. I., *Ob osobenostiah obmena veșcestv u razlicinîh po morozostoikosti plodovîh kultur*. *Fiziologhiia ustoicivosti rastenii*, Moscova, 1960, 240.
24. Proțenko D. F., Bogomaz E. I., *Harakteristika pigmentoi sistemî Korî u razlicinîh pomorozostoikosti plodovîh kultur*. *Fiziologhiia ustoicivosti rastenii*, Moscova, 1960, 269.
25. Saakian R. G., *Fiziologo-biohimiceskie osobenosti vinogradnoi lozî v sviazî s eë morozostoikostiu*. *Fiziologiia ustoicivosti rastenii*, Moscova, 1960, 331.
26. Saakian R. G., *Cu privire la particularitățile fiziologo-biochimice de rezistență la ger a viței de vie*. Rev. ref. agr. *10* (1955); în Biohimia vinodelia, *4*, 226 (1955).
27. Soru Eugenia, *Biochimia medicală*, ed. a 2-a, I, Edit., medicală, București, 1959.
28. Walter J. R. L., *Enzymic browning of apples. II. Properties of apple polyphenoloxidase*, Austr. J. biol. Sci., **17**, 360 (1964).

ST. CERC. BIOCHIM., 9, 1, 21–24 (1966)

PURIFICAREA CRIOPROTEINEI DIN MAZĂRE SUB CONTROL IMUNOCHIMIC

LUCIA BUZILĂ

577.1

Rezumat. — Un preparat purificat de crioproteină, obținut din sămînța de mazăre, supus analizelor imunoelectroforetice și cromatografice, prezintă două componente.

Studiul crioprecipitării unor proteine din semnițele plantelor trebuie efectuat pe preparate pure alcătuite numai din molecule proteice înzestrate cu capacitatea de a precipita la rece. Pentru izolarea și purificarea crioproteinei se pot folosi metode fizico-chimice sau metoda specifică de precipitare la rece.

Ne-am oprit la acest ultim procedeu, bazați pe observațiile anterioare după care crioprecipitarea proteinelor din sămînță este un proces reversibil, care poate fi reprodus de nenumărate ori [1]. Pînă în prezent au fost izolate și purificate crioproteinele din semințele de soia, cu ajutorul ultracentrifugării [2], și de bumbac, cu ajutorul precipitărilor fracționate cu $SO_4(NH_4)_2$, urmate de ultracentrifugare [3].

MATERIAL ȘI METODE

Am folosit semințe de mazăre (*Pisum sativum*), soiul Ceres, recolta anului 1964.

Obținerea crioproteinei. Făina de mazăre s-a extras cu apă distilată, în raport de 1 parte făină la 5 părți apă distilată. Amestecul s-a agitat timp de 30 min, pe agitatorul magnetic, iar extractul obținut a fost limpezit printr-o centrifugare de 30 min la 6 000 g, la temperatura camerei.

Supernatantul a fost lăsat la rece (4—5°C) 7—8 ore, timp în care are loc crioprecipitarea. S-a centrifugat apoi tot la rece (4—5°C), timp de 15 min la 6 000 g, după care s-a obținut primul crioprecipitat. Supernatantul se aruncă. Precipitatul obținut s-a dizolvat, la temperatura camerei, în soluție 0,145 M de NaCl, luată într-o cantitate egală cu jumătate din volumul supernatantului din care s-a separat precipitatul. S-a reținut din proba dizolvată o cantitate foarte mică, pentru analiza imunoelectroforetică, iar restul s-a pus la rece (4—5°C), unde precipită din nou crioproteina. Cu aceasta s-au repetat operațiile de mai sus, reluîndu-se dizolvările la temperatura camerei, urmate de precipitări la rece, pînă cînd spectrul imunoelectroforetic al crioprecipitatului nu s-a mai modificat. Acest lucru a survenit după 6 crioprecipitări. Ultimul

crioprecipitat a fost reluat în apă distilată și liofilizat. Substanța liofilizată a fost păstrată la rece, în exsicator, peste Cl_2Ca, și a fost folosită la nevoie.

Analiza imunochimică. Preparatele obținute după fiecare din cele 6 crioprecipitări au fost analizate imunoelectroforetic.

Imunoelectroforeza s-a făcut după micrometoda Scheidegger [4], în tamponul borat-fosfat pH 7,6 [5]. Concentrația tamponului în cuvă a fost de 0,28 M acid boric, iar în plăci de 0,085 M. S-a folosit un gel de agar Difco-Noble 1,3%, un potențial de 20 V/cm, intensitatea de 1 mA/cm și un timp de migrare de 2 ore și 30 min.

Colorarea plăcilor s-a făcut cu Amidoschwarz, după metodele folosite curent [6].

Antiserurile au fost obținute de la iepuri imunizați cu proteina totală extrasă din sămînța întreagă de mazăre. S-au injectat între 50 și 200 mg de proteină, în asociație cu adjuvant Freund, timp de 42 de zile. Antiserurile au avut un titru precipitant cuprins între 0,5 și 2,0 μg/ml de antigen (diluția antiserului 1 :5).

Analiza electroforetică în gel de agar a crioproteinei a fost făcută în aceleași condiții ca și imunoelectroforeza, cu singura deosebire că aici timpul de migrare a fost de $3^1/_2-4$ ore. Colorarea plăcilor a fost făcută cu Amidoschwarz sau cu albastru de bromfenol.

Analiza cromatografică. S-a folosit DEAE-celuloză Serva (capacitate 0,64 mEq/g), introdusă într-o coloană de 17/1,7 cm. Coloana a fost încărcată cu 12 mg de crioproteină liofilizată, dizolvată în 2 ml tampon de eluție. Eluția s-a făcut cu tampon fosfat 0,02 M, pH 8,0, folosindu-se un gradient de concentrație de NaCl cuprins între 0,15 și 0,6 M. Viteza de curgere a fost de 40 ml/oră, colectîndu-se probe de cîte 2 ml, care au fost imediat spectrofotometrate la 280 mμ. Experiențele au fost efectuate la temperatura de +20°C.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Prin precipitarea repetată a crioproteinei din mazăre se obține o imagine din ce în ce mai simplă a imunoelectroforegramelor (fig. 1). Astfel, încă de la prima reprecipitare dispar o serie de linii din regiunile leguminei și albuminelor. Se mențin liniile de precipitare din zona corespunzătoare vicilinei. O linie din zona anodică se menține pînă la a 4-reprecipitare, pentru ca după aceea să dispară. După a 5-a reprecipitare nu rămîne decît o singură linie puternică în zona vicilinei, dublată de o linie slabă în aceeași zonă. La a 6-a reprecipitare se obține aceeași imagine imunoelectroforetică. Faptul că arcul de precipitare mai slab, mai depărtat de șanțul anticorpilor, se menține, deși reprecipitările continuă, nu infirmă posibilitatea existenței unei impurități antigenice de care crioproteina să nu poată fi debarasată pe această cale.

Faptul că în soluțiile purificate de crioproteină nu s-a găsit linia de precipitare existentă la extractul total în zona leguminei se poate explica prin cantitatea de precipitat care nu poate fi reluată în NaCl 0,145—0,2 M, la temperatura camerei. Nu am analizat acest precipitat, deoarece am considerat că el nu reprezintă o crioproteină autentică, ci o proteină denaturată. Potrivit definiției [1], crioproteinele trebuie să manifeste nu numai proprietatea de a precipita la rece, ci și pe aceea de a se redizolva la temperatura camerei în soluții saline adecvate. Or, deși este solubilă în NaCl 0,2 M [7], legumina nu se găsește în soluțiile rezultate prin redizolvarea crioprecipitatului. Prezența leguminei în precipitatul obținut la prima crioprecipitare ar putea explica observația lui D. Briggs și W. J. Wolf

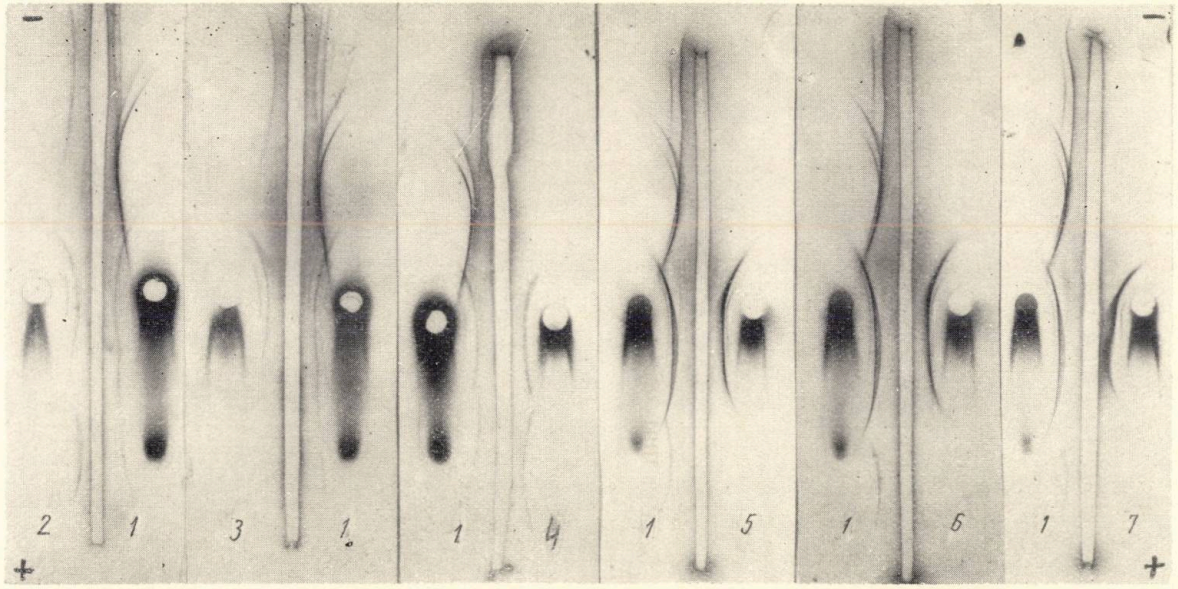


Fig. 1. — Analiza imunoelectroforetică a etapelor de purificare a crioproteinei.
1. Proteina totală. 2. Prima crioprecipitare. 3. A doua crioprecipitare. 4. A treia crioprecipitare. 5. A patra crioprecipitare. 6. A cincea crioprecipitare. 7. A şasea crioprecipitare.

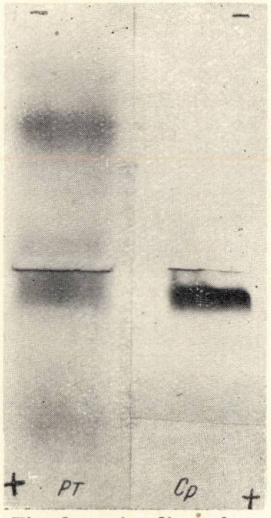


Fig. 2. — Analiza electroforetică a crioproteinei obţinute.

[1], care semnalează prezența ambelor proteine în precipitatul depus la rece.

Electroforeza crioproteinei purificate de noi (fig. 2) ne arată o singură fracțiune, a cărei viteză de migrare este identică cu cea a vicilinei.

Analiza cromatografică a preparatului obținut indică existența a doi componenți : unul omogen, A, și celălalt eterogen, B (curba cromatografică asimetrică), ambii neabsorbiți de DEAE-celuloză la pH-ul experimentului. Continuînd cromatografia în gradient de NaCl, nu se mai eluează nici un component în cantitate semnificativă (fig. 3).

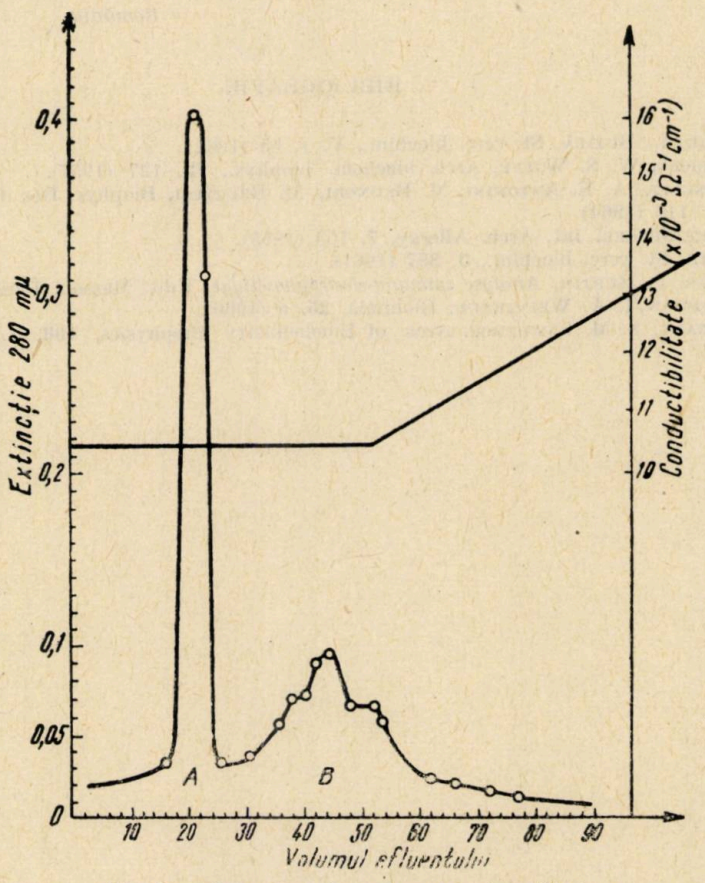


Fig. 3. — Cromatografia crioproteinei purificate.

Fracțiunea cromatografică B poate reprezenta fie o impuritate, fie un agregat molecular alcătuit din moleculele componentului A. Această ultimă presupunere este întărită și de datele lui D. R. Grant și S. M. Lawrence [8], care arată că vicilina monomeră și dimeră poate fi separată prin cromatografie pe DEAE-celuloză.

CONCLUZII

Preparatul de crioproteină obţinut din sămînţa de mazăre şi supus unei purificări înaintate, prin crioprecipitări repetate, prezintă două linii de precipitare la imunoelectroforeză şi s-a separat în două componente prin cromatografie pe DEAE-celuloză.

Prezentată la redacţie
la 12 octombrie 1965

Institutul de biochimie al
Academiei Republicii Socialiste
România

BIBLIOGRAFIE

1. V. Gheţie, L. Buzilă, St. cerc. biochim., **V**, *1*, 65 (1962).
2. D. R. Briggs, W. S. Wolff, Arch. biochem. biophys., **72**, 127 (1957).
3. Rossi-Fanelli, A. E. Antonini, M. Brunori, M. Bruzzesi, Biophys. Res. Commun.. **15**, 110 (1964).
4. J. J. Scheidegger, Int. Arch. Allergy, **7**, 103 (1955).
5. V. Gheţie, St. cerc. biochim., **3**, 397 (1961).
6. P. Grabar, P. Burtin, *Analyse immuno-electrophorétique*, Edit. Masson, Paris, 1960.
7. I. I. Goffman, I. A. Weintraub, Biohimia, **25**, 6 (1960).
8. D. R. Grant, S. M. Lawrence, Arch. of Biochemistry Biophysics, **108**, *3*, 552 (1964).

ST. CERC. BIOCHIM., 9, 1, 25–32 (1966)

INFLUENȚA SUPLIMENTĂRII MĂLAIULUI CU VITAMINE ȘI AMINOACIZI ASUPRA ACTIVITĂȚII UNOR ENZIME DIN FICAT

ILEANA DINU

622.14

Rezumat. — S-a cercetat pe 64 de șobolani albi, tineri, influența suplimentării mălaiului cu vitamine din grupul B și cu lizină, triptofan, treonină, izoleucină și leucină asupra creșterii, asupra conținutului în proteine și acid dezoxiribonucleic (ADN) al ficatului, precum și asupra activității transaminazei glutamic oxalaceticc (GOT), fosfatazei acide, fosfatazei alcaline și succindehidrogenazei hepatice (SD).

Adaosul de vitamine a dus la o ușoară ameliorare a ingestei și a creșterii, fără să modifice activitatea enzimelor cercetate.

Suplimentarea mălaiului cu L-lizină (0,4 g %), DL-triptofan (0,06 g %) și DL-treonină (0,05 g %) a produs o stimulare a creșterii, a eficienței proteice și a ingestei, precum și o scădere a activității fosfatazei acide și alcaline. Adaosul de L-izoleucină în concentrație de 0,05 și 0,1 g % nu a influențat nici unul dintre indicatorii urmăriți. La suplimentarea rației maidice cu 0,2 g% L-leucină s-a înregistrat o scădere a activității GOT, iar la 1 g% L-leucină o inhibiție a creșterii, o scădere a concentrației proteinelor hepatice și a activității SD, precum și o creștere a activității fosfatazei alcaline.

În cercetări anterioare [6] am constatat că activitatea succindehidrogenazei [SD], fosfatazei alcaline și catepsinei este mai crescută la șobolanii alimentați cu o rație maidică decît la cei hrăniți cu rația care conținea cazeină 8 g%.

Considerînd că stabilirea influenței regimurilor maidice asupra activității unor enzime hepatice poate contribui la elucidarea mecanismului acțiunii distrofiante a porumbului, am urmărit modificările care apar în activitatea aceloraşi enzime după corectarea sau dezechilibrarea compoziției porumbului prin suplimentare cu vitamine sau aminoacizi.

I. SUPLIMENTAREA PORUMBULUI CU VITAMINE DIN GRUPUL B

Experiențele au fost efectuate pe 16 șobolani albi, tineri, proveniți din aceeași generație, apropiați ca greutate și împărțiți în 2 loturi de cîte 4 masculi și 4 femele pe lot.

Lotul I a fost hrănit cu mălai la care s-a adăugat ulei de floarea-soarelui (2 g%). Conținutul regimului în azot era de 1 462 g N%, ceea ce reprezintă 9,14 g proteine brute %.

Lotul II a primit o rație izoproteică (9,14 g%) alcătuită din mălai la care s-au încorporat 4 g% de ulei de floarea-soarelui, 3 g% amestec de săruri (după Osborne-Mendel) și un amestec de vitamine din grupul B, în proporție optimă pentru dezvoltarea șobolanului [12], și anume (în mg pentru 100 g de hrană) : tiamină 5, riboflavină 5, niacină 60, acid pantotenic 20, piridoxină 2,5, acid folic 0,2, ciancobalamină 0,02, inozitol 100 și colină 1500. Animalele din ambele loturi primeau săptămînal 270 u.i. de vitamină A, 100 u.i. de vitamină D_2 și 1 mg de vitamină E.

Apa și hrana s-au administrat *ad libitum*, iar timp de 4 săptămîni s-au urmărit ingesta, din 2 în 2 zile, și cîștigul săptămînal în greutate. Cunoscînd atît adaosul ponderal, cît și consumul și compoziția regimului, s-a calculat eficiența proteică (cîștigul în greutate pe g de proteină ingerată).

La sfîrșitul experienței animalele au fost sacrificate prin decapitare, recoltîndu-se ficatul, care a fost cîntărit și omogenat la gheață cu manitol 0,25 M. În omogenatul 10% s-a determinat conținutul în proteine totale și acid dezoxiribonucleic (ADN), precum și activitatea succindehidrogenazei (SD), transaminazei glutamic oxalacetice (GOT), fosfatazei acide și fosfatazei alcaline. Metodele folosite au fost expuse într-o lucrare anterioară [6].

Rezultatele obținute arată că adaosul vitaminelor a dus la o ușoară ameliorare a ingestei și creșterii. Astfel, ingesta medie a lotului vitaminizat a fost cu 16% mai crescută decît aceea a lotului martor, iar greutatea cu 12% mai crescută (62,6 $\pm$ 1,66 g față de 55 $\pm$ 3,2 g), diferența dintre valorile medii fiind semnificativă ($P < 0{,}04$). Eficiența proteică a lotului vitaminizat, deși mai crescută, nu s-a deosebit semnificativ de aceea găsită la lotul martor. Nici greutatea ficatului, nici conținutul lui în proteine și în ADN nu au fost influențate de suplimentarea mălaiului cu vitamine, și nici activitatea enzimelor cercetate nu a prezentat deosebiri statistic semnificative între cele două loturi.

Aceste rezultate concordă cu concluziile la care I. Gonțea și colab. au ajuns într-un studiu efectuat pe 600 de șobolani. Suplimentînd rația maidică cu niacină, tiamină, riboflavină și piridoxină, nu au obținut o ameliorare semnificativă nici în creșterea animalelor, nici în eficiența proteică [8].

Ineficiența suplimentării cu vitamine B în tratamentul și prevenirea distrofiei maidice experimentale la cîine a fost constatată atît în cercetările lui A. Sporn și colab. [18], cît și în cele ale lui H. Aizicovici [3].

Cercetările sistematice efectuate în decursul anilor în țara noastră [7—9] permit să se tragă concluzia că, deși porumbul aduce un aport redus de niacină în rația alimentară, suplimentarea regimului maidic cu niacină nu reușește să prevină sau să vindece tulburările funcționale și metabolice caracteristice distrofiei maidice experimentale. Faptul că în cercetările noastre suplimentarea cu vitamine nu a ameliorat activitatea enzimelor cercetate este în concordanță cu ipoteza emisă de I. Gonțea [9] că suplimentul de biocatalizatori nu-și poate exercita efectul, datorită lipsei unui material proteic adecvat.

II. SUPLIMENTAREA PORUMBULUI CU LIZINĂ, TRIPTOFAN ȘI TREONINĂ

Experiențele s-au făcut pe două loturi de cîte 8 șobolani albi. Ca lot martor s-au folosit animalele din experiența anterioară, care au primit rația maidică suplimentată cu vitamine. Lotul experimental a primit aceeași rație, însă suplimentată cu aminoacizi. În suplimentarea porumbului cu aminoacizi s-a ținut seama de concluziile cercetării lui H. Rosenberg [16] atît în privința ordinii limitanților, cît și a concentrațiilor lor, și anume : L-lizină 0,4 g%, DL-triptofan 0,06 g% și DL-treonină 0,05 g%. Deși izoleucina este considerată ca limitant egal cu treonina [16], totuși efectul ei a fost cercetat într-o variantă experimentală separată.

Pentru a putea compara rația suplimentată cu lizină, triptofan și treonină cu rația lotului martor, conținutul în porumb s-a redus corespunzător cu adaosul de N aminoacidic, realizîndu-se astfel un conținut de N în rația lotului martor de 1,462 g%, respectiv 9,14 g% proteine, iar în rația lotului suplimentat cu lizină, triptofan și treonină un conținut de 1,466 g N%, respectiv de 9,16 g% proteine. Indicatorii folosiți au fost aceiași ca în experiența anterioară.

Rezultatele obținute arată că suplimentarea rației maidice cu lizină, triptofan și treonină a produs o stimulare importantă a creșterii (tabelele 1 și 2), greutatea finală a lotului experimental fiind de 201% față de aceea a lotului martor.

Tabela 1

Influența suplimentării porumbului cu L-lizină, DL-triptofan și DL-treonină asupra unor enzime hepatice, conținutului în proteine și ADN al ficatului și creșterii șobolanului alb (valori medii pe lot raportate la ficat umed)

Indici	porumb + vitamine	LTT	P
SD : gamma form./mg	1,21±0,10	1,18±0,04	> 0,05
GOT : μM piruvat/g	460±40	520±28	> 0,05
Fosfatază acidă : μMP/g	17±1,41	12±0,65	< 0,002
Fosfatază alcalină : μMP/g	21±1,06	17±0,92	< 0,005
ADN : gamma/mg	1,35±0,09	1,17±0,05	> 0,05
Proteine : mg/g	141±9,7	151±7,5	> 0,05
Greutate finală : g	62,6±1,66	126±2,99	< 0,001
Ingesta : g/zi	83±0,21	13,5±0,35	< 0,001
Eficiența prot.	0,59±0,02	1,36±0,04	< 0,001
Greutate ficat : g	2,9±0,14	5,5±0,14	< 0,001
Greutate ficat g/100 g corp	4,5±0,25	4,4±0,09	> 0,05

În comparație cu datele obținute în lucrările anterioare pe animale care au primit o rație izonitrică de cazeină [6], rezultă că animalele care au primit rația maidică suplimentată cu lizină, triptofan și treonină cresc mai bine. Greutatea finală a lotului care a primit rația maidică suplimentată cu lizină, triptofan și treonină este asemănătoare cu aceea a unui lot care a primit o rație de cazeină cu un conținut proteic de 15,55 g%. Diferențele importante în creștere se datoresc atît ameliorării ingestei, cît și

eficienței proteice. Trebuie subliniat însă faptul că în timp ce eficiența proteică s-a îmbunătățit cu 223%, ingesta a crescut numai cu 162%, ceea ce arată că diferențele înregistrate în creștere se datoresc în mai mare măsură ameliorării anabolismului proteic, datorită unui mai bun echilibru aminoacidic al rației, realizat prin suplimentarea cu lizină, triptofan și treonină.

A. E. Harper [13] interpretează scăderea ingestei la animalele cu regimuri dezechilibrate ca efect al modificării concentrației aminoacizilor din sînge, ceea ce ar determina scăderea apetitului. După această interpretare, faptul că suplimentarea rației de mălai ameliorează mult ingesta ar sugera că porumbul suplimentat cu lizină, triptofan și treonină prezintă o structură aminoacidică complet echilibrată. Dat fiind însă că eficiența proteică este mai scăzută decît la un regim izonitric realizat cu cazeină, se impun rezerve asupra acestei concluzii. Datele noastre sînt în acord cu concluziile lui H. R. Rosenberg cu privire la limitanța lizinei, triptofanului și treoninei și la eficiența suplimentării rației maidice cu acești aminoacizi în concentrațiile indicate.

În paralel cu stimularea creșterii, adaosul de lizină, triptofan și treonină a determinat și o mărire a greutății ficatului, fără a influența conținutul în proteine și ADN pe g de organ umed (tabela 1), însă cantitatea totală a acestora din ficat a crescut mult (205%), depășind coeficientul de creștere a greutății ficatului (189%) și a conținutului de ADN din ficat (160%), ceea ce indică o concentrare relativă a proteinelor hepatice.

Suplimentarea porumbului cu lizină, triptofan și treonină a determinat o scădere semnificativă a activității fosfatazei acide și fosfatazei alcaline (tabela 1). În interpretarea acestor rezultate mai trebuie să se țină seama de faptul că raportarea activității enzimatice la g de ficat umed oglindește activitatea enzimei în valoare absolută.

Pentru a putea aprecia influența factorului cercetat asupra funcției metabolice a ficatului, T. Terroine [20] recomandă într-o sinteză recentă raportarea rezultatelor la conținutul de proteine al întregului ficat, considerînd că relația dintre intensitatea proteinogenezei tisulare (hepatice) și activitatea enzimatică ar reflecta nivelul și direcția sintezelor din ficat. Într-adevăr, raportarea rezultatelor la conținutul în proteine al întregului ficat indică diferențe importante, statistic semnificative, între lotul martor și lotul care a primit suplimentul de lizină, triptofan și treonină (tabela 2). În ceea ce privește raportul dintre creșterea sintezei proteinelor hepatice și creșterea activității enzimelor (SD, GOT), se constată un ritm asemănător (205%, respectiv 186 și 213%), în timp ce ritmul de creștere a ADN-ului este mai mic (160%). Date din literatură [1], [2] arată că la administrarea unor proteine deficitare sinteza proteică este dirijată preferențial către producerea enzimelor necesare. Faptul că în experiențele de față sinteza proteică a crescut paralel cu intensificarea activității SD și GOT ar pleda în favoarea ipotezei că regimul maidic suplimentat cu lizină, triptofan și treonină echilibrează procesele de sinteză proteică din ficat. Trebuie totuși subliniat că activitatea SD și GOT, precum și concentrația proteinelor pe g de ficat umed în lotul suplimentat cu lizină, triptofan și treonină,

nu ajung la nivelul valorilor găsite în experiențele anterioare pentru lotul cu 15,5 g% proteine și sînt mai apropiate de cele ale lotului cu 9,7g% proteine.

III. SUPLIMENTAREA PORUMBULUI CU IZOLEUCINĂ ȘI LEUCINĂ

Efectul distrofiant al regimurilor maidice a fost atribuit de unii autori dezechilibrului datorit leucinei și izoleucinei, care, după C. Gopalan [10], ar produce o depleție a niacinei din țesuturi. După alți autori [4], excesul de leucină ar micșora excreția de triptofan, datorită unei blocări a absorbției triptofanului. G. Truswell [19] a comunicat că administrarea de L-leucină la bolnavii de pelagră nu a modificat excreția de N-metil-

Tabela 2

Influența suplimentării porumbului cu L-lizină, DL-triptofan și DL-treonină asupra unor enzime hepatice, conținutului în proteine și ADN al ficatului și creșterii șobolanului alb (valori medii pe lot raportate la proteine totale hepatice).

Indici	Porumb + vitamine	LTT	P
SD : gamma form./mg	3487±254	6504±246	< 0,001
GOT : μM piruvat/g	1335± 84	2853±136	< 0,001
Fosfatază acidă : μMP/g	50± 4,2	69±3,9	< 0,001
Fosfatază alcalină : μMP/g	60±5,0	92±4,72	< 0,001
ADN : gamma/mg	3984±272	6401±275	< 0,001

nicotinamidă. A. E. Harper [11], [17], studiind problema antagonismului între leucină și izoleucină pe șobolani, stabilește că excesul de leucină determină o întîrziere puternică a creșterii. I. Gonțea [8], [9], suplimentînd rația maidică cu 0,6 g% L-izoleucină, a găsit că adăugarea acestui aminoacid la mălai a agravat efectul distrofiant al porumbului.

Ținînd seama de caracterul contradictoriu al datelor din literatură, noi am urmărit rolul dezechilibrului leucină-izoleucină în producerea tulburărilor metabolice determinate de regimul maidic. În acest scop s-a încercat o diminuare a dezechilibrului leucinic natural, prin suplimentarea mălaiului cu izoleucină, iar prin suplimentare cu leucină o accentuare a dezechilibrului existent în porumb.

Experiențele s-au efectuat pe 24 de șobolani albi, tineri, împărțiți în trei loturi, după cum urmează : lotul I a primit o rație maidică suplimentată cu vitamine, lizină, triptofan și treonină, în aceleași proporții ca și în experiențele anterioare. Lotul II a primit același regim, suplimentat cu 0,05 g % L-izoleucină, doză considerată ca suficientă pentru înlăturarea limitanței acestui aminoacid în porumb [16], întrucît prin această suplimentare raportul leucină-izoleucină scade de la 5,6 la 2,4 [15], cît este în proteinele din lapte [2], [3]. Conținutul în N al rației a fost de 1,47 g%, iar cel de proteine de 9,196 g%. Lotul III a primit un regim similar cu cel

al regimului martor, suplimentat cu 0,2 g% L-leucină. Prin această suplimentare, raportul leucină-izoleucină s-a ridicat la 11,9. Conținutul de N al rației a fost de 1,48 g%, respectiv 9,25 g proteine %.

Rezultatele obținute arată că suplimentarea rației cu L-izoleucină în concentrație de 0,05 g% nu a influențat semnificativ nici creșterea animalelor, nici concentrația proteinelor și a ADN din ficat, nici activitatea enzimelor cercetate. Acest rezultat este în dezacord cu concluzia lui H. R. Rosenberg [16] referitoare la caracterul limitant al izoleucinei în rațiile maidice.

Suplimentarea rației cu 0,2 g% L-leucină a determinat numai o scădere semnificativă a activității GOT (tabela 3). Adaosul de L-leucină (0,2 g%) nu a agravat evident antagonismul leucină-izoleucină, așa cum au obținut alți cercetători [17] prin suplimentarea cu leucină a regimului în care proteinele erau furnizate de cazeină (9%).

Pentru a verifica și a elucida aceste neconcordanțe, experiențele s-au repetat, mărindu-se suplimentul de L-izoleucină la 0,1 g%, ceea ce corespunde unui raport leucină-izoleucină de 0,66 (raportul în proteina de ou fiind de 1,1). Suplimentul de leucină s-a mărit la 1 g DL-leucină și 0,5 g L-leucină la 100 g de hrană. Considerînd că DL-leucina s-ar utiliza în proporție de 50%

Tabela 3

Influența suplimentării porumbului cu L-lizină, DL-triptofan, DL-treonină și L-leucină asupra unor enzime hepatice, conținutului în proteine și ADN al ficatului și creșterii șobolanului alb (valori medii pe lot raportate la ficat umed)

Indici	Experiența I*			Experiența II**		
	LTT	LTT + leucină	P	LTT	LTT + leucină	P
S.D : gamma/mg	1,18±0,04	1,06±0,07	>0,05	1,39±0,07	1,16±0,06	<0,02
GOT : μM piruvat/g	520±28	450±18	<0,05	542±35	517±39	>0,05
Fosfatază acidă : μMP/g	12±0,65	11±0,60	>0,05	12±0,43	15±1,64	>0,05
Fosfatază alcalină : μMP/g	17±0,92	16±1,1	>0,05	19±1,7	24±1,81	<0.05
ADN : gamma/mg	1,17±0,05	1,21±0,07	>0,05	1,46±0,07	1,32±0,04	>0,05
Proteine : mg/g	151±7,5	158±7,7	>0,05	171±8,0	125±7,4	<0,001
Greutate finală : g	126±2,99	113±8,5	>0,05	102,8±2,4	90,5±4,3	<0,01
Ingesta : g/zi	13,4±0,35	11,8±0,84	>0,05	11,1±0,5	95±2,09	>0,05
Eficiența prot.	1,36±0,03	1,36±0,08	>0,05	1,27±0,04	1,14±0,03	<0,003
Greutate ficat : g	5,5 ±0,14	5,2±0,23	>0,05	3,9±0,21	3,9±0,25	>0,05
Greutate ficat g/100 g corp	4,4±0,09	4,6±0,25	>0,05	3,7±0,14	4,2±0,25	>0,05

* L-leucină 0,2%
** L-leucină 1%

[15], ar rezulta un aport suplimentar de L-leucină de aproximativ 1 g%. În această condiție, raportul leucină-izoleucină atinge valoarea de 35,6. Conținutul în N al rației a fost de 1,726 g% N, respectiv 10,8 g proteine.

Rezultatele obținute arată că majorarea suplimentului de izoleucină nu a influențat semnificativ nici unul dintre indicatorii folosiți. În acest fel se confirmă rezultatele primei experiențe, conducînd la concluzia că, în condițiile noastre experimentale, izoleucina nu a reprezentat un aminoacid limitant al rației maidice. Ineficiența suplimentării rației maidice cu izoleucină (0,05%), precum și neagravarea dezechilibrului prin suplimentarea cu 0,2% leucină (creșterea raportului leucină-izoleucină la 11,9), sugerează concluzia că dezechilibrul leucină-izoleucină nu are un rol hotărîtor în determinarea acțiunii distrofiante a regimurilor maidice.

Rezultatele noastre sînt în concordanță cu concluziile lui I. Gonțea și colab. [8], [9], privind ineficiența suplimentării cu L-izoleucină, precum și cu concluziile lui G. Truswell (19) privind rolul excesului de leucină în patogenia pelagrei.

Adaosul de leucină (1%) a deprimat creșterea, greutatea finală a animalelor la sfîrșitul experienței fiind semnificativ mai scăzută decît a lotului martor (tabela 3). Acest fapt a fost observat și de alți cercetători [17] după suplimentarea cu leucină (3—7%) a unui regim ce conținea 9 g% cazeină. Diferențele în creștere se datoresc scăderii proteinogenezei, care rezultă din micșorarea cu 27% a conținutului de proteine din ficat și din reducerea cu 7% a activității SD. Fosfataza alcalină a fost cu 26% mai activă decît la lotul martor, iar valorile medii ale fosfatazei acide și ale GOT nu au prezentat deosebiri semnificative. Aceste date arată că efectul leucinei în concentrație de 1% se exercită mai mult asupra activității enzimatice decît asupra creșterii.

Din cercetările lui A. E. Harper [17] rezultă că efectul negativ al excesului de leucină asupra creșterii dispare într-o perioadă de 3—14 zile, în raport cu concentrația de leucină folosită (3—7%), fapt atribuit de autor adaptării animalelor la regimul experimental. Totodată, s-a stabilit existența unei adaptări în timp a diferitelor sisteme enzimatice, în raport cu modificarea regimului alimentar [14], [21]. Este interesant de cunoscut măsura în care animalele hrănite cu regimuri maidice sînt capabile să realizeze o adaptare metabolică. Elucidarea acestui aspect al problemei constituie obiectul cercetărilor noastre în curs de efectuare.

CONCLUZII

1. Suplimentarea unei rații maidice cu vitamine din grupul B, deși a determinat o ușoară ameliorare a creșterii șobolanului alb, nu a reușit să modifice nici unul dintre indicatorii urmăriți.
2. Adaosul de L-lizină (0,4%), DL-triptofan (0,06%) și DL-treonină (0,05%) a determinat o ameliorare a creșterii la nivelul unui lot care a primit o rație de cazeină cu un conținut proteic de 15,5 g%.

3. Activitățile enzimelor cercetate, precum și concentrația proteinelor pe g de ficat umed, sînt apropiate de cele ale unui lot cu 9,7 g% proteine. Efectul pozitiv al suplimentării este atribuit echilibrării proceselor de sinteză proteică din ficat.
4. Suplimentarea cu L-izoleucină (0,05 și 0,1%) nu a influențat nici unul dintre indicatorii urmăriți.
5. Adaosul de L-leucină (1%) a produs o deprimare a creșterii, o scădere a proteinelor hepatice și a activității succindehidrogenazei, precum și o creștere a activității fosfatazei alcaline.

Prezentată la redacție al 5 octombrie 1965

Secția de igienă a alimentației, Institutul de igienă și sănătate publică, București

BIBLIOGRAFIE

1. *** *Threonine deprivation and protein synthesis*, Nutr. Revs., **23**, *4*, 111—112 (1965).
2. *** *Protein depletion and amino-acid activation*, Nutr. Revs., **21**, *11*, 344—345 (1963).
3. Aizicovici H., *Contribuții la studiul factorilor care determină efectul distrofiant al porumbului*, autoreferat, Iași, 1964.
4. Belavady B., Srikantia S. G., Gopalan C., *The effect of the oral administration of leucine on the metabolism of tryptophan*, Biochem. J., **87**, *3*, 652—655 (1963).
5. Block Richard J., Bolling Diana, *The amino-acid composition of proteins and foods, Analytical methods and results*, ed. a 2-a, Springfield, Illinois, Ch. A. Thomas, 1951.
6. Dinu I., *Influența cantității și calității proteinelor asupra activității unor enzime din ficat*, St. cerc. Biochim, **2**(1966).
7. Gonțea I., *Acțiunea pelagrogenă a porumbului*, Viața medicală, an. V. *2*, februarie 1958.
8. Gonțea I., Șuțescu P., Cosma V., Cocora D., *Cercetări asupra posibilităților de contracarare a efectului distrofiant al porumbului*, Igiena, **XI**, *4*, 281—303 (1962).
9. Gonțea I., Șuțescu Paraschiva, *Acțiunea distrofiantă a porumbului și posibilități de contracarare*, St. și cerc. igienă și sănătate publică, București, p. 55—89 (1964).
10. Gopalan C., Srikantia S. G., *Leucine and pellagra*, Lancet, **I**, 7 131, 954—957 (1960).
11. Harper A. E., Benton D. A., Winje M. E. , Elvehjem C. A., *Leucine-izoleucine antagonism in the rat*, Arch. biochem. biophys., **51**, *2*, 523—524 (1954).
12. Harper A. E., Benton D. A., Elvehjen C. A., *L-leucine, an izoleucine antagonist in the rat*, Arch. Biochem. Biophys. **57**, *1*, 1—12 (1955).
13. Harper A. E., Leung P., Yoshida A., Rogers Q. R., *Some new thoughts on amino-acid imbalance*, Feder. Proc., **23**, *5*, part. I, 1087—1092 (1964).
14. Knox W. E., Auerbach V. H., Lin E.C.C., *Enzymatic and metabolic adaptations in animals*, Physiol. Rev., **36**, *2*, 165—254 (1956).
15. Meister Alton, *Biochemistry of the amino-acids*, Academic Press, New York, 1957.
16. Rosenberg H. R., Rohdenburg E. L., Eckert R. E., *Multiple amino-acid supplementation of white corn meal*, J. Nutrition, **72**, *4*, 415—422 (1960).
17. Spolter P. D., Harper A. E., *Leucine-izoleucine antagonism in the rat*, Amer. J. Physicl., **200**, *3*, 513 (1961).
18. Sporn A., Fostiropol Ana, *Influența naturii proteinelor și a unor vitamine asupra distrofiei maidice la cîine*, St. cerc. igienă și sănătate publică, București, 91—111 (1964).
19. Truswell A. S., Goldsmith G. A., Pearson W. N., *Leucine and pellagra*, Lancet, **I**, 778—779 (1963).
20. Terroine Therese, *Le controle vitaminique des activités enzymatiques*, Annales nutr. et alim., **XVIII**, *4*, 87—184 (1964).
21. Willmer J. S., Foster T. S., *Enzymatic and metabolic adaptation. I. Changes in intact rats subjected to dietary modifications*, Canad. J. Biochem. Physiol., **40**, 7, 953 (1962).

ST. CERC. BIOCHIM., 9, 1, 33–38 (1966)

MUCOPOLIZAHARIDE DIN DIVERSE ȚESUTURI ALE TRACTULUI DIGESTIV

I. A. MOLNAR, JEANETTE WINTER, EUGENIA TUCICOV, VIORICA PELLONI și NINA URICARU

547.963.1

Rezumat. — S-a studiat conținutul în mucopolizaharide acide, care pot prezenta interes ca substanțe cu acțiune antilipemică și hipocolesterolemiantă, în diverse țesuturi ale tractului digestiv de bovine și porcine. S-a folosit următoarea schemă de lucru : țesutul uscat în vid și delipidat prin extracție cu eter de petrol este supus unei hidrolize acide la pH 4,5, urmată de extracție apoasă la pH 6,8 și 8,0. După concentrare, se efectuează o digestie proteolitică, urmată de dializă. Proteinele se precipită cu acid tricloracetic, iar mucopolizaharidul cu acetonă. Cantități între 25 și 200 μg mucopolizaharid se supun electroforezei pe hîrtie, la pH 8,6. Porțiunea corespunzătoare mucopolizaharidului se decupează, se eluează cu apă distilată și, după hidroliză cu acid sulfuric, conținutul în acizi uronici se determină prin reacția de culoare cu carbazol. Cantitatea de mucopolizaharid este 2,94 × valoarea acidului hexuronic obținută prin colorimetrare.

Duodenul de vită și de porc au un conținut în mucopolizaharide de 0,95, respectiv de 0,79%, mucoasele duodenale de 0,46, respectiv de 0,76%, intestinul subțire are un conținut apropiat de cel al duodenului (0,74, respectiv 0,73%), iar mucoasa intestinală 0,55, respectiv 0,80%. În ceea ce privește stomacul și mucoasele corespunzătoare, ele sînt mai sărace în mucopolizaharide. Mucoasele stomacale conțin mai mult decît organul total.

Se cunoaște că heparina, pe lîngă activitatea sa anticoagulantă, are acțiune și asupra metabolismului lipidelor, în special al colesterolului. S-a ivit problema obținerii unor substanțe care să influențeze metabolismul lipidic, fără să aibă un efect însemnat asupra coagulării sîngelui.

Capraro, Cantone și Cresseri [1] au arătat că extracte obținute din mucoasa stomacală de porc, care conțin mucopolizaharide au acțiune asupra metabolismului lipidelor, intensitatea acțiunii fiind proporțională cu conținutul în acid hexuronic. Această constatare a permis autorilor să treacă la purificarea și izolarea mucopolizaharidului. Într-o lucrare de ansamblu [2], Cresseri descrie modul de obținere și proprietățile acestei substanțe. Produsul obținut de acești cercetători este un mucopolizaharid acid care conține 34,6% acid hexuronic (D-glucuronic), 21,1% hexozamină (D-glucozamină), 25,5% substanțe reducătoare (D-glucoză), 6,1% grupe acetil și 0,5% sulf.

Bianchini [3] a obţinut un mucopolizaharid acid din duoden şi intestinul subţire de porc, care are acţiune asupra metabolismului lipidelor, în special al colesterolului, însă activitatea anticoagulantă este mult mai mică decît aceea a heparinei. Produsul obţinut de Bianchini conţine între 31,8 şi 38,2% acid hexuronic şi 24,3% hexozamină. Nu se ştie dacă produsele obţinute de autorii citaţi sînt identice între ele.

În ultimii ani interesul a crescut mult faţă de substanţele care pot influenţa metabolismul lipidelor în general şi al colesterolului în special şi care ar putea fi folosite în terapeutica cazurilor de hipercolesterolemie. Nu se găsesc indicaţii asupra conţinutului în acest tip de mucopolizaharide al diferitelor organe şi ţesuturi.

Determinarea mucopolizaharidelor dintr-un ţesut se poate efectua după eliberarea sa din cenapse, ceea ce se poate realiza printr-o hidroliză blîndă, urmată de extracţie. Din extractul obţinut, mucopolizaharidele pot fi precipitate selectiv şi determinate gravimetric, ca săruri de moniu cuaternar [4], [5], ca săruri de cetilpiridiniu sau cetiltrimetilamoniu.

După o altă metodă, mucopolizaharidele pot fi precipitate printr-un solvent organic, ca alcoolul sau acetona, iar produsul obţinut se supune electroforezei, pentru izolarea fracţiunii electroforetice care conţine mucopolizaharidul. Determinarea cantitativă poate fi făcută fie prin coloraţia metacromatică pe care mucopolizaharidele o dau cu albastrul de toluidină, fie prin determinarea acidului hexuronic.

În lucrarea noastră am adus modificări tehnicilor uzuale de determinare a mucopolizaharidelor în materiale biologice.

MATERIAL ŞI METODE

În experienţele noastre am studiat următoarele organe şi ţesuturi : duoden total de bovine şi porcine, mucoasă duodenală de bovine şi porcine, intestin subţire de bovine şi porcine, mucoasă de intestin subţire de la bovine şi porcine, mucoasa intestinului subţire de porcine, stomac (rumen) de bovine, stomac de porcine, mucoasă stomacală (rumen) de bovine şi mucoasă stomacală de porcine. Aceste ţesuturi pot fi folosite pentru determinare fie proaspete, colectate imediat după sacrificarea animalelor, fie congelate la −20°C pînă la efectuarea determinării. Pentru determinări am folosit probe medii luate din ţesuturile colectate de la cel puţin 25 de animale. Înainte de folosire, ţesuturile colectate se curăţă de grăsimi şi de orice alt ţesut străin. Proba de analizat se toacă la o maşină de tocat cu ochiuri de 2−3 mm diametru. Materialul tocat se usucă în vid, în strat subţire, de preferinţă pe valţuri, la circa 30−35°C. În aceste condiţii, componenţii ţesutului nu suferă degradări. Prin eliminarea apei se desfac legăturile unor cenapse şi extracţia ulterioară a substanţelor din interiorul celulelor este mult uşurată.

Din ţesutul uscat se elimină lipidele prin extracţie cu un solvent organic adecvat, care poate să fie eterul etilic, benzenul, toluenul, eterul de petrol, cloroformul, diclormetanul. În lucrările noastre am folosit eterul de petrol. Extracţia lipidelor trebuie făcută pînă la epuizare completă, ceea ce se realizează prin 6−10 extracţii. Eliminarea solventului din ţesutul degresat se face sub vid, la 35°C. Cantitatea de material degresat obţinută se raportează la cantitatea iniţială pusă în lucru.

Produsul obţinut se amestecă cu 8 volume de apă distilată, iar pH-ul soluţiei se aduce la 4,5−5,0 cu acid clorhidric. Amestecul se încălzeşte sub agitare permanentă, la fierbere.

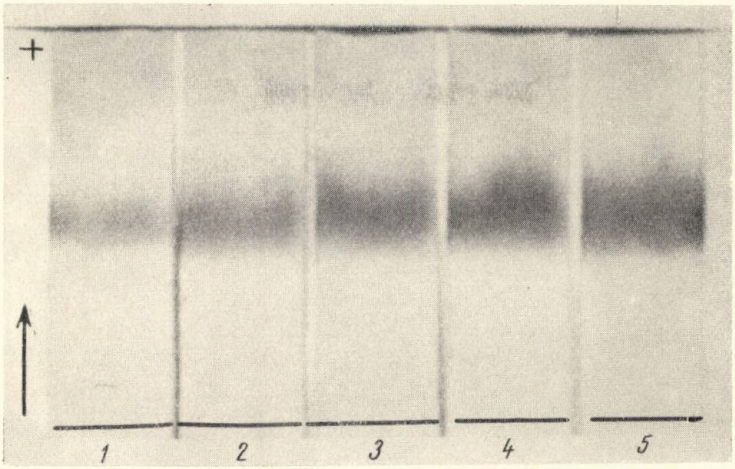


Fig. 1. — Electroferogramele cu albastru de toluidină a 5 doze de mucopolizaharide : 1=30 μg ; 2=60 μg ; 3=90 μg ; 4=120μg ; 5=180 μg.

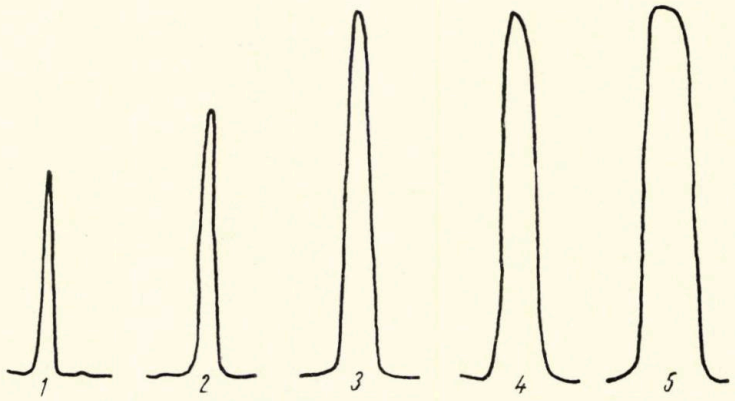


Fig. 2. — Curbele de densitometrare ale celor 5 doze de mucopolizaharide.

După răcire la 70°C se adaugă o soluție de hidroxid de sodiu 10%, sub agitare continuă, pînă, ce pH-ul este adus la 6,8. Se amestecă timp de 2 ore și apoi pH-ul se ajustează la 8,0, după care se mai ține o oră la 70°C. Se centrifughează la cald. Reziduul de extracție se extrage încă de trei ori cu apă distilată, la pH 8,0 și se centrifughează. Extractele unite se concentrează în vid, la 30—40°C.

Pentru 100 de părți de țesut pus în lucru se adaugă extract din patru părți de pancreas în H_2SO_4 0,25 N, pH-ul se aduce la 7,5—8,0 cu hidroxid de sodiu 10% și amestecul se ține la 37—40°C, sub agitare lentă, într-un vas de sticlă închis. Pentru evitarea infecțiilor în cursul procesului de digerare enzimatică, se poate adăuga fenol sau crezol 0,5%, sau se acoperă soluția cu un strat de toluen. Enzimele pancreatice eliberează mucopolizaharidele de substanțele proteice, care în continuare sînt hidrolizate fără să acționeze asupra mucopolizaharidelor. Durata hidrolizei enzimatice este de 48 de ore. În acest interval de timp, pH-ul trebuie corectat în permanență și menținut la 7,5—8,0. După terminarea hidrolizei soluția se filtrează, reziduul de filtrare se spală cu apă distilată, iar soluția obținută se concentrează în vid pînă la circa un sfert din cantitatea țesului pus în lucru. Soluția obținută, a cărei densitate este în jur de 1,20, se supune unei dialize pe membrană de celofan, față de apă curentă. Prin dializă se elimină sărurile, aminoacizii, peptidele cu greutate moleculară mică și alte substanțe cristaloide. Se recomandă ca în timpul dializei soluția să fie acoperită cu un strat de toluen. Durata dializei este de minimum 48 de ore. În timpul dializei volumul soluției crește de 2—3 ori. Soluția se concentrează din nou în vid, la a 20-a parte față de cantitatea pusă în lucru. Se adaugă o soluție de acid tricloracetic de 50%, pînă se atinge concentrația de 10% în acid tricloracetic. Proteinele nedigerate precipită și se elimină prin centrifugare. Precipitatul se spală de două ori cu acid tricloracetic 10%. Din soluțiile unite mucopolizaharidul se precipită, adăugînd în fir subțire, sub agitare, 5 volume de acetonă. Mucopolizaharidul se depune sub forma unui precipitat gumos. După cîteva ore de sedimentare, se decantează soluția acetonică limpede supernatantă, iar precipitatul se spală de 4—5 ori cu acetonă, pînă cînd devine mai consistent, apoi se usucă în vid.

În substanța obținută după metoda descrisă mai sus, cantitatea de mucopolizaharid poate să fie determinată după două principii diferite [2], [3]. În ambele cazuri, produsul este supus unei electroforeze pe hîrtie, la pH 8,6, în tampon borat. După terminarea electroforezei, benzile de hîrtie se colorează cu albastru de toluidină. După una dintre variante, intensitatea colorației albastre obținute este proporțională cu cantitatea de mucopolizaharid din probă, ceea ce se poate determina după densitometrare în comparație cu un etalon de concentrație cunoscută. În varianta cealaltă se fac paralel migrări electroforetice în condiții identice ; una dintre benzi se colorează cu albastru de toluidină, pentru stabilirea poziției mucopolizaharidului pe hîrtie, iar din cealaltă bandă se decupează zona corespunzătoare, care se eluează și se determină conținutul în acid hexuronic după metoda Dische [6], față de acid glucuronic ca etalon. Din conținutul de acid hexuronic se calculează conținutul în mucopolizaharid.

În studiul nostru am verificat ambele metode, pentru a stabili cu care dintre ele se obțin rezultate mai precise și comparabile între ele.

A. Pentru verificarea primei variante, am procedat în modul următor :

Cantitatea de substanță corespunzătoare la 3 mg de mucopolizaharid se dizolvă într-un ml de tampon borat, la pH 8,6. Tamponul borat se prepară în modul următor : 12,404 g acid boric se dizolvă în 100 ml de hidroxid de sodiu N și se aduc cu apă la 1 000 ml ; 680 ml din această soluție se aduc la 1 000 ml cu acid clorhidric 0,1 N ; pH-ul trebuie să fie 8,6±0,1.

Pe fîșii de hîrtie Whatmann nr. 1, de 4 cm lățime, se spotulează cu o micropipetă cantități crescînde de soluție, între 0,01 și 0,06 ml, corespunzătoare la 30—180 μg de mucopoli-

zaharid. Produsul este supus electroforezei într-un aparat Beckman de tip Durum, în tampon borat la pH 8,6 şi la tensiunea de 5 V/cm. Durata electrolizei : între 5 şi 8 ore. După uscare la 105°C se tratează timp de 3 min cu o soluţie de albastru de toluidină (0,5 g albastru de toluidină se dizolvă în 50 ml de alcool metilic şi 50 ml de soluţie apoasă de acid acetic 5%), apoi se spală de 5 ori în soluţie apoasă de acid acetic 5%. Prin această spălare colorantul este îndepărtat, iar petele de mucopolizaharid rămîn mai departe colorate în albastru. Benzile se usucă apoi la temperatura camerei. După diafanizarea benzilor în ulei de parafină, se densitometrează. Prin densitometrare se obţin curbe ale căror suprafeţe sînt proporţionale cu intensitatea coloraţiei, care la rîndul ei este proporţională cu cantitatea de mucopolizaharid luat în lucru. Curbele obţinute se planimetrează

B. După efectuarea electroforezei conform punctului A, partea din bandă care conţine mucopolizaharidul se decupează şi se eluează cu apă distilată. Conţinutul în acid hexuronic se determină după metoda Dische [6], prin hidroliză în acid sulfuric şi reacţie de culoare cu carbazol. Determinarea intensităţii coloraţiei se face comparativ cu o soluţie de acid glucuronic, tratată în condiţii identice. Conţinutul în acid hexuronic × 2,94 dă conţinutul în mucopolizaharid.

Comparînd rezultatele obţinute prin cele două metode, am constatat că nu există întotdeauna o corelaţie între ele. Cauza neconcordanţelor este faptul că mucopolizaharidele cu structuri diferite nu dau cu albastrul de toluidină aceeaşi intensitate de coloraţie. Prin urmare, metoda de la punctul A poate să fie folosită numai atunci cînd determinăm un acelaşi mucopolizaharid faţă de un etalon stabilit.

În cazul metodei bazate pe determinarea conţinutului în acid hexuronic, datele pot fi comparate între ele. În experienţele noastre am folosit în toate cazurile cele două metode de determinare, însă concluziile le-am tras pe baza rezultatelor obţinute cu acidul hexuronic.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Un exemplu de electroforeză efectuată cu mucopolizaharid obţinut din mucoasa stomacală de porcine la diferite concentraţii este arătat în figura 1. După diafanizare şi densitometrare s-au obţinut graficele din figura 2, care la rîndul lor au fost planimetrate ; rezultatele au fost trecute în figura 3, din care se vede că suprafeţele planimetrate sînt proporţionale cu cantitatea de mucopolizaharid pusă în lucru.

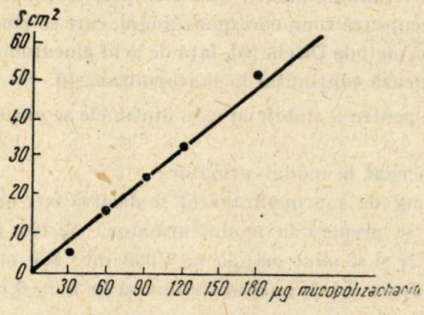


Fig. 3. — Diagrama de planimetrare a celor 5 doze de mucopolizaharide.

Mediile rezultatelor obţinute prin metoda în care conţinutul în mucopolizaharid se calculează din conţinutul în acid hexuronic sînt redate, pentru diferite ţesuturi, în tabela 1.

Din rezultatele înscrise în tabela 1 se vede că, la bovine şi porcine, ţesuturile totale studiate de acelaşi fel au un conţinut de mucopolizaharide apropiat ca ordin de mărime. Conţinutul duodenului şi al intestinului subţire este mai ridicat decît al stomacelor. În ceea ce priveşte repartiţia,

mucopolizaharidelor între mucoasa duodenală și duodenul total de porcine precum și între mucoasa, musculoasa și intestinul total de porcine, nu s-au găsit diferențe apreciabile. În cazul mucoaselor duodenale și intestinale de bovine, conținutul în mucopolizaharid al mucoaselor este mai mic

Tabela 1

Conținutul țesuturilor în mucopolizaharide (MPZ)

Denumirea țesutului și specia	Conținut în MPZ (g/1000 g țesut proaspăt)
Duoden total de bovine	0,95
Mucoasa duodenală de bovine	0,46
Duoden total de porcine	0,79
Mucoasă duodenală de porcine	0,76
Intestin subțire de bovine	0,74
Mucoasă intestinală subțire de bovine	0,55
Intestin subțire de porcine	0,73
Mucoasă intestinală subțire de porcine	0,80
Musculoasa intestinului subțire de porcine	0,81
Stomac de bovine (rumen)	0,27
Mucoasă stomacală de bovine (rumen)	0,38
Stomac de porcine	0,23
Mucoasa stomacală de porcine	0,51

decît al țesutului total, ceea ce s-ar putea explica prin conținutul ridicat în apă al mucoaselor respective. În cazul stomacelor, mucoasele sînt mai bogate decît țesutul total.

CONCLUZII

Conținutul în mucopolizaharide al tractului digestiv de bovine și porcine variază între 0,23 și 0,95%.

Țesuturile totale de bovine și porcine au un conținut de mucopolizaharide apropiat ca ordin de mărime. Duodenul și intestinul subțire conțin mai mult decît stomacul. În duodenul și intestinul subțire de porcine, repartiția mucopolizaharidului este asemănătoare în mucoasă și în țesutul total. În stomacele de bovine și porcine, mucoasele conțin mai multe mucopolizaharide decît țesutul total.

Prezentată la redacție la 6 iulie 1965

Institutul de cercetări chimico-farmaceutice, București

BIBLIOGRAFIE

1. Capraro V., Cantone A., Cresseri A., *Azzione chiarificante del plasma indotta con somministrazione orale difrazioni muciniche dalla mucosa gastrica di maiale*, Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., **30**, 1381 (1954).

2. Cresseri A., *Identification and isolation of some components in a mucin preparation from pig gastric mucose; their chemical, physical and biological properties*, Racolta di publicazione chimiche, **II**, 235 (1956).
3. Bianchini P., *A new heparinoid compound*, Patent englez nr. 889 010 (1957).
4. Schiller S., Glover G. A., Dorfman A., *A method for the separation of acid mucopolysacharides*, J. biol. Chem., **236**, 983 (1961).
5. Korn E. D., *Isolation of heparine from mouse mast cell tumor*. J. biol. Chem., **234**, 1325 (1959).
6. Dische Z., *A new specific color reaction of hexuronic acid*, J. biol. Chem., **167**, 189 (1947).

ST. CERC. BIOCHIM., 9, 1, 39–47 (1966)

STUDIUL ELECTROFORETIC ŞI METACROMATIC AL MUCOPOLIZAHARIDELOR DIN ŢESUTURILE TRACTULUI DIGESTIV

I. A. MOLNAR şi JEANETTE WINTER

547.963.1

Rezumat. — S-a făcut un studiu comparativ între mucopolizaharidele din diverse ţesuturi ale tractului digestiv şi heparina, în ceea ce priveşte viteza de migrare electroforetică şi reacţia de culoare cu albastrul de toluidină. Viteza de migrare pe hîrtie la pH 8,6 în tampon borat a fost de $4,9 \times 10^{-5}$ pentru heparină şi între 5,1 şi $5,6 \times 10^{-5}$ pentru celelalte mucopolizaharide. La pH 1,0 viteza de migrare a heparinei este de $4,35 \times 10^{-5}$, iar a celorlalte mucopolizaharide a fost cuprinsă între 1,74 şi $2,61 \times 10^{-5}$, ceea ce arată că mucopolizaharidele studiate sînt acizi mai slabi decît heparina.

Prin adăugare de heparină la o soluţie de albastru de toluidină, maximul de extincţie al soluţiei de albastru de toluidină se deplasează de la 640 la 560 m μ, iar cu un exces de heparină apare o altă reacţie şi un maximum la 640 mμ, însă aspectul curbei de extincţie diferă de cel al albastrului de toluidină. Urmărind extincţia la 640 sau 560 mμ în funcţie de cantitatea de heparină, apare un punct de inflexiune.

Un fenomen similar se petrece şi cu mucopolizaharidele studiate. Maximele de extincţie succesive apar la 600 şi 640 mμ. Prin această reacţie în două etape se poate deosebi heparina de mucopolizaharidele studiate. Cantitatea de mucopolizaharid la care apare punctul de inflexiune este diferită după originea acestuia.

Într-o lucrare anterioară [1] am studiat conţinutul în mucopolizaharide acide al ţesuturilor tractului digestiv de bovine şi porcine. În prezenta lucrare, ne-am propus studierea unor proprietăţi fizico-chimice ale acestor mucopolizaharide acide, şi anume : viteza lor de migrare electroforetică şi coloraţia metacromatică pe care o dau în comparaţie cu heparina ; aceasta cu scopul de a stabili dacă pot fi diferenţiate pe aceste căi atît de heparină, cît şi între ele.

Cresseri [2], în cazul mucopolizaharidului obţinut din mucoasa stomacală de porc la pH 6,0, în tampon fosfat, găseşte în sistem descendent $U = 8,9 \times 10^{-5}$, iar în sistem ascendent $U = 9,3 \times 10^{-5}$.

Bianchini [3], care a studiat mucopolizaharidele acide din intestin şi duoden, indică pentru două mucopolizaharide notate cu F şi P, a căror origine nu este precizată, următoarele valori în tampon borat, la pH 8,6 :

Mucopolizaharid tip F $U = 5{,}0 \times 10^{-5}$
Mucopolizaharid tip P $U = 3{,}9 \times 10^{-5}$
Heparină $U = 6{,}67 \times 10^{-5}$

Pe de altă parte, mai mulţi autori au arătat că mucopolizaharidele reacţionează cu albastrul de toluidină, al cărui spectru de absorbţie se modifică, maximul benzii de absorbţie deplasîndu-se de la 630 mμ spre lungimi de unde mai mici. Lungimea de undă şi extincţia maximului sînt în funcţie de natura şi concentraţia mucopolizaharidului.

Bianchini [4] indică într-un grafic aspectul spectrului de absorbţie pentru un mucopolizaharid obţinut din duoden de porc şi pe care l-a denumit Ateroid. Maximul de extincţie este situat în jur de 600 mμ, ceea ce diferă de heparină, aceasta deplasînd maximul la 560 mμ, după cum a stabilit Curri [5].

Acest din urmă autor descrie o tehnică uşor aplicabilă pentru determinarea reacţiei metacromatice. Această tehnică a fost folosită în experienţele noastre, în care am urmărit evoluţia coloraţiei formate în funcţie de concentraţia mucopolizaharidelor de diferite provenienţe, în comparaţie cu heparina.

MATERIAL ŞI METODE

În experienţele noastre, determinarea vitezei de migrare electroforetică a mucopolizaharidelor s-a realizat pe hîrtie Whatman 3MM, în sistem orizontal, într-un aparat Karl Zeiss Jena, la pH 8,6 şi 1,0.

Viteza de migrare electroforetică s-a calculat din ecuaţia :

$$U = \frac{d}{t.F}$$

în care : U = constanta vitezei de migrare electroforetică ; d = distanţa în cm de la start ; t = timpul în secunde (durata migrării) ; F = raportul diferenţei de potenţial exprimate în volţi şi distanţa exprimată în cm, între cei doi electrozi.

În calcularea vitezei de migrare nu s-a făcut corecţia pentru electroendosmoză.

Pentru pH 8,6 am folosit un tampon borat cu următoarea compoziţie : 12,404 g de acid boric şi 100 ml NaOH N se aduc la 1 000 ml cu apă distilată, iar la 680 ml din această soluţie se adaugă 320 ml HCl 0,1 N. Pentru pH 1,0 am folosit HCl 0,1 N. Durata migrării a fost de 16 ore şi diferenţa de potenţial de 4 V/cm. Din substanţa de analizat s-au făcut soluţii care conţin cantitatea corespunzătoare de 3 mg/ml în apă distilată la pH 7,6—8,0, din care se spotulează cu o micropipetă 0,01 ml, adică 30 μg pe spot. Identificarea electroferogramei s-a făcut cu o soluţie de albastru de toluidină de 0,5 %, într-un amestec de părţi egale de alcool metilic şi acid acetic 20 %, urmată de 5 spălări în acid acetic 5 %.

La migrările efectuate la pH 8,6 s-a observat pentru toate substanţele o singură bandă. La pH 1,0, pentru heparină şi cîteva probe de mucopolizaharid s-a observat o bandă principală cu viteză de migrare mai mare şi o bandă cu intensitate mult mai slabă şi viteza de migrare mai mică.

Pentru determinarea reacției metacromatice, s-a folosit următorul mod de lucru :

a) se pregătește o soluție de albastru de toluidină 2×10^{-5} M (0,0061 g/l) ;

b) se pregătește soluția de mucopolizaharid de diferite concentrații (conținutul în mucopolizaharid a fost calculat în funcție de conținutul în acid hexuronic, considerînd că mucopolizaharidul pur are 32% acid hexuronic). Soluțiile s-au făcut în tampon fosfat M/15 la pH 7. La 29 ml de soluție de albastru de toluidină se adaugă 1 ml din soluția de mucopolizaharid și se determină spectrul de absorbție la un spectrofotometru între 500 și 700 m μ.

În lucrarea noastră am urmărit modificările spectrelor de absorbție în funcție de concentrația mucopolizaharidelor. În cazul heparinei se observă că coloratia albastră a albastrului de toluidină se transformă progresiv în violet, nuanță care atinge un maxim, iar la mărirea concentrației trece progresiv într-o colorație albastră-verzuie, ceea ce denotă două reacții succesive,

Au fost studiate produsele obținute din următoarele țesuturi : intestin subțire de bovine și porcine, duoden de porcine și bovine, stomac de bovine (rumen) și porcine, mucoasa intestinului subțire de bovine și porcine, mucoasa duodenală de bovine și porcine, mucoasa stomacală de bovine și porcine. Heparina a fost folosită ca martor.

REZULTATE

Vitezele de migrare obținute la cele două valori de pH sînt redate în tabela 1. În figurile 1 și 2 sînt reprezentate spectrele de absorbție obținute cu cantități diferite de heparină, cuprinse între 12,5 și 8 000 μg.

Din spectrele obținute se constată că banda de absorbție de la 640 mμ a albastrului de toluidină dispare, iar o bandă situată la 560 mμ apare progresiv, cu creșterea cantității de heparină. La cantități de peste 60 μg de heparină în probă, maximul de extincție de la 560 mμ scade progresiv și apare un alt spectru, cu maximul de extincție situat la 640 mμ, ca la soluția de albastru de toluidină, alura curbei fiind însă diferită.

Urmărind valorile de extincție la anumită lungime de undă caracteristică, de preferință unde se situează maximul de extincție, sau urmărind raportul de extincție la două lungimi de undă caracteristice, se poate urmări mersul reacției.

În cazul heparinei, modificările spectrale au fost urmărite la 640 mμ și 560 mμ și sînt redate în figura 3.

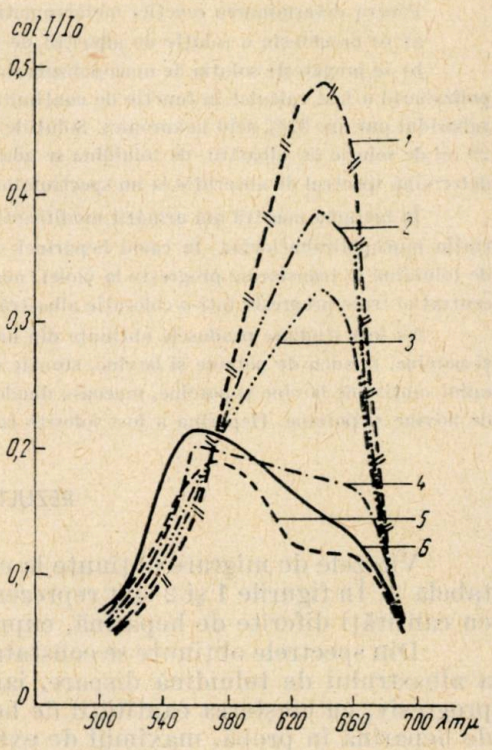
Tabela 1

Viteza de migrare a mucopolizaharidelor la diferite valori de pH

Denumire	Proveniență	U × 10^{-5}		
		pH 1,0		pH 8,6
Heparină	Plămîn de vită	4,3	1,67	4,9
Mucopolizaharid	Intestin de porc	1,74	—	5,6
	Mucoasă de intestin subțire de porc	2,61	0,67	5,1
	Mucoasă de stomac de porc	1,78	0,67	5,4
	Mucoasă de stomac de vită	2,01	—	5,2
	Mucoasă de duoden de porc	2,39	0,87	—

Fig. 1. — Spectrul de absorbţie al albastrului de toluidină (AT) în prezenţa heparinei în diferite cantităţi în probă.

1 AT
2. AT şi 12,5 μg heparină în probă
3. AT şi 25 μg heparină în probă
4. AT şi 50 μg heparină în probă
5. AT şi 75 μg heparină în probă
6. AT şi 200 μg heparină în probă



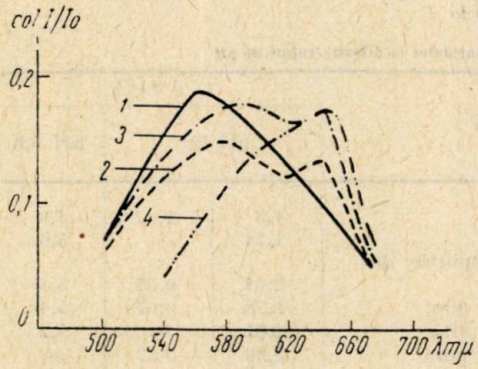
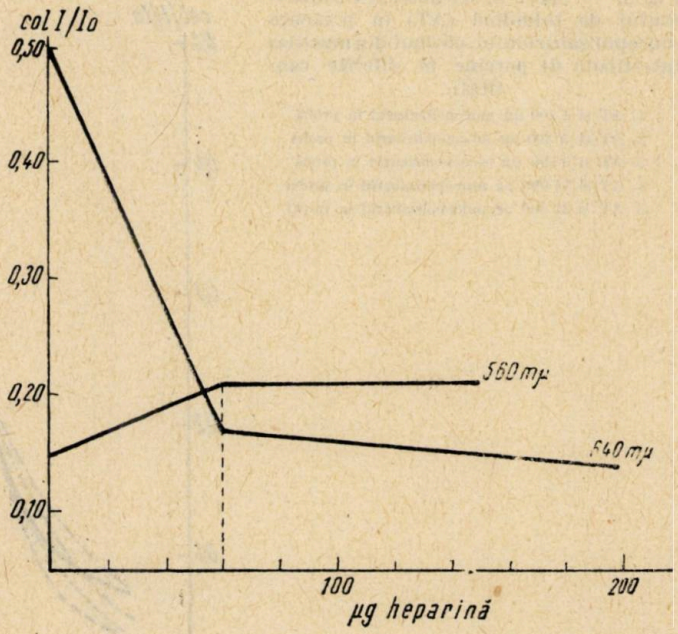


Fig. 2. — Spectrul de absorbţie a albastrului de toluidină (AT) în prezenţa heparinei în diferite cantităţi în probă.

1. AT şi 1 000 μg heparină în probă
2. AT şi 3 000 μg heparină în probă
3. AT şi 5 000 μg heparină în probă
4. AT şi 8 000 μg heparină în probă

Fig. 3. — Modificările spectrale ale albastrului de toluidină în funcţie de cantitatea de heparină în probă.



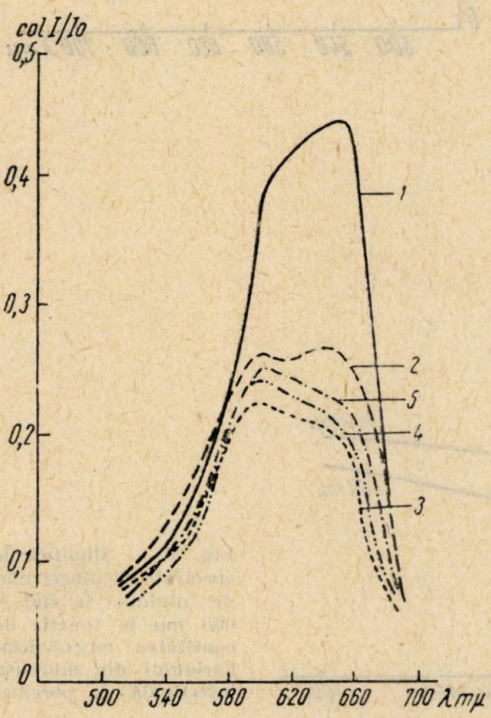
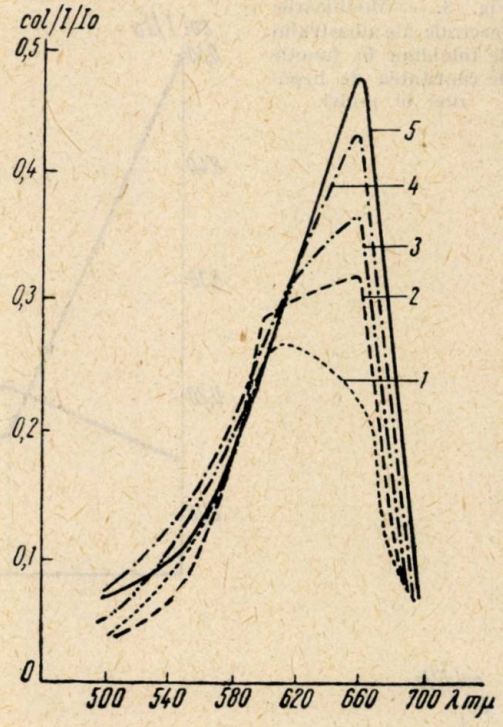


Fig. 4. — Spectrul de absorbţie a albastrului de toluidină (AT) în prezenţa mucopolizaharidului obţinut din mucoasa intestinală de porcine în diferite cantităţi în probă.

1. AT
2. AT şi 100 μg mucopolizaharid în probă
3. AT şi 300 μg mucopolizaharid în probă
4. AT şi 500 μg mucopolizaharid în probă
5. AT şi 700 μg mucopolizaharid în probă

Fig 5. — Spectrul de absorbție a albastrului de toluidină (AT) în prezența mucopolizaharidului, obținut din mucoasa intestinală de porcine în diferite cantități.

1. AT și 1 100 µg mucopolizaharid în probă
2. AT și 3 300 µg mucopolizaharid în probă
3. AT și 5 500 µg mucopolizaharid în probă
4. AT și 11 000 µg mucopolizaharid în probă
5. AT și 22 000 µg mucopolizaharid în probă



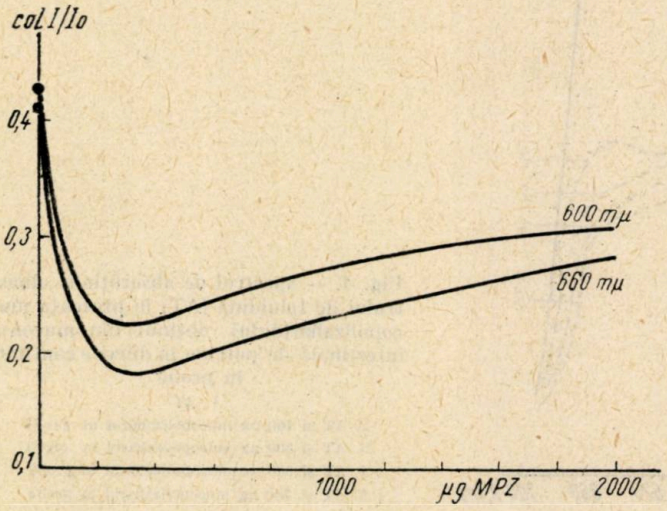


Fig. 6. — Modificările spectrale ale albastrului de toluidină la 600 și 660 mµ în funcție de cantitatea mucopolizaharidului din mucoasa intestinală de porcine.

La 60 μg de heparină în probă corespunde un punct de inflexiune, ceea ce echivalează cu 139 g de heparină pentru 1 mol de albastru de toluidină.

Cu mucopolizaharidele preparate de noi din diferite țesuturi am urmărit reacția metacromatică după aceeași metodă ca și în cazul heparinei. În figurile 4 și 5 sînt date modificările spectrului de absorbție al albastrului de toluidină, obținute cu diferite cantități de mucopolizaharid din mucoasa intestinală de porcine.

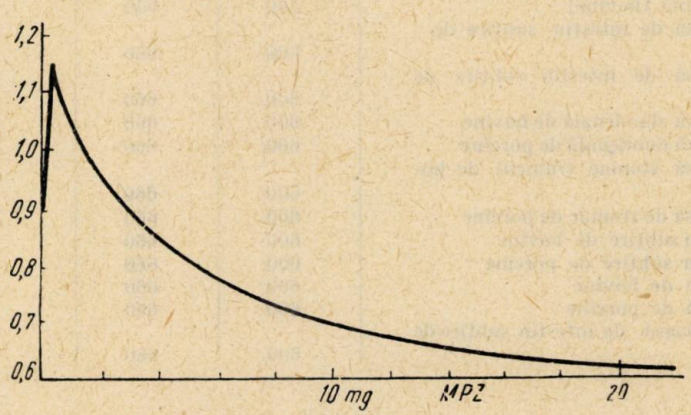


Fig. 7. — Modificările raportului de extincție la 600/640 mμ în funcție de cantitatea de mucopolizaharid din mucoasa intestinală de porcine.

În general, fenomenul este asemănător cu cel obținut la heparină. În funcție de conținutul în mucopolizaharid, spectrul se modifică, banda de absorbție de la 640 mμ a albastrului de toluidină dispare și în schimb apare un alt maxim la 600 mμ, ceea ce diferențiază în mod net mucopolizaharidul de heparină. La cantități mai mari de mucopolizaharid în probă, această bandă dispare, în schimb apare alta, cu maximul de extincție la 660 mμ, și care nu coincide nici cu banda albastrului de toluidină, nici cu cea modificată sub influența heparinei. Pentru stabilirea punctului de inflexiune, am urmărit extincția la 600 și 640 mμ, precum și raporturile lor. Rezultatele sînt redate în figurile 6 și 7.

Punctul de inflexiune corespunde la 94 g de mucopolizaharid pentru 1 mol de albastru de toluidină.

În continuare au fost studiate asemănător și mucopolizaharidele obținute din celelalte tesuturi. Rezultatele obținute sînt rezumate în tabela 2.

Ca aspect general, se reproduce fenomenul observat cu produsul obținut din mucoasa intestinală de porc.

La cantitate mică de mucopolizaharid apare maximum de extincție la 600 mμ, iar la cantități mari la 660 mμ. Spectrele de absorbție sînt asemănătoare fără a fi identice.

Tabela 2

Modificările spectrale ale albastrului de toluidină sub influenţa mucopolizaharidelor (MPZ) de diferite proveniențe

Denumirea preparatului	Maximul benzii de extincţie mμ		g MPZ echivalent la 1 mol albastru de toluidină la punct de inflexiune
	cu conc. mică de MPZ	cu conc. mare de MPZ	
Albastru de toluidină (AT)	640		—
AT + heparină (bovine)	560	640	139
AT + mucoasă de intestin subţire de bovine	600	660	688
AT + mucoasă de intestin subţire de porcine	600	660	94
AT + mucoasă duodenală de bovine	600	660	—
AT + mucoasă duodenală de porcine	600	660	344
AT + mucoasă stomac (rumen) de bovine	600	660	86
AT + mucoasă de stomac de porcine	600	660	160
AT + intestin subţire de bovine	600	660	120
AT + intestin subţire de porcine	600	660	94
AT + duoden de bovine	600	660	344
AT + duoden de porcine	600	660	475
AT + musculoasă de intestin subţire de porcine	600	660	86

DISCUŢII

Din datele obţinute la electroforeza mucopolizaharidelor studiate la diferite valori de pH, în comparaţie cu heparina se constată că valorile obţinute la pH 8,6 sînt cuprinse între $U = 5,1$ şi $5,6 \times 10^{-5}$, diferenţele fiind în limitele erorilor experimentale. La acest pH, acest tip de mucopolizaharid nu se poate diferenţia net de heparină, valorile U fiind foarte apropiate. La pH 1,0 însă, valorile se grupează între 1,7 şi $2,6 \times 10^{-5}$ pentru fracţiunea principală a mucopolizaharidelor, iar heparina are $U = 4,35 \times 10^{-5}$. În aceste condiţii de lucru, heparina se diferenţiază deci net de grupul mucopolizaharidelor studiate, iar pe baza acestor rezultate se poate afirma că heparina este un acid cu un coeficient de disociere mai mare decît mucopolizaharidele extrase din ţesuturile studiate.

În ceea ce priveşte reacţiile de culoare pe care mucopolizaharidele studiate le dau cu albastrul de toluidină, modificările spectrale în funcţie de cantitatea mucopolizaharidului arată că sînt două reacţii succesive, fenomen observat şi cu heparina. Mucopolizaharidele obţinute din ţesuturile tractului digestiv au un caracter comun, şi anume : maxima de extincţie în prima treaptă este situată la 600 mμ, iar în a doua treaptă la 660 mμ, ceea ce este deosebit de spectrul pe care-l dă cu albastrul de toluidină heparina, în care caz valorile de extincţie se situează la 560 mμ, respectiv la 640 mμ. Cantitatea mucopolizaharidului la care se obţine punctul de inflexiune în modificarea spectrală variază de la un mucopolizaharid la altul. Nu am găsit interpretarea acestui fenomen.

CONCLUZII

1. Prin electroforeza pe hîrtie la pH 8,6, mucopolizaharidele extrase din diferite țesuturi ale tractului digestiv de bovine și porcine nu s-au putut diferenția de heparină, dar la pH 1,0 viteza de migrare electroforetică a heparinei este $4{,}35 \times 10^{-5}$, mai mare decît a mucopolizaharidelor studiate, care se situează între 1,7 și $2{,}6 \times 10^{-5}$. În acest fel, acest grup de mucopolizaharide pot fi diferențiate și separate electroforetic de heparină.

2. Din datele obținute se poate conchide că heparina are un caracter de acid mai puternic disociat decît mucopolizaharidele studiate.

3. Prin studiul reacției de colorație cu albastrul de toluidină în funcție de cantitatea de mucopolizaharid, s-a constatat că atît cu heparina, cît și cu mucopolizaharidele obținute din diverse țesuturi ale tractului digestiv, colorația se modifică în două etape, prezentînd un punct de inflexiune bine definit. În cazul heparinei, în prima etapă apare o bandă de extincție la 560 mμ și în a doua etapă la 640 mμ. La toate celelalte mucopolizaharide studiate, în prima etapă banda apare la 600 mμ, iar în a doua etapă la 660 mμ, ceea ce caracterizează acest grup de mucopolizaharide și permite diferențierea lor de heparină.

4. Spectrele obținute cu diverse mucopolizaharide sînt asemănătoare, fără a fi identice. Cantitatea la care apare punctul de inflexiune al modificării spectrale diferă de la caz la caz.

Prezentată la redacție la 6 iulie 1965

Institutul de cercetări chimico-farmaceutice, București

BIBLIOGRAFIE

1. Molnar I. A., Winter J., Tucicov E., Pelloni V., Uricaru N., *Mucopolizaharide din diverse țesuturi ale tractusului digestiv*, St. cerc. biochim., **9**, *1*, 33 (1966).
2. Cresseri A., *Identification and isolation of some components in a mucin preparation from pig gastric mucosee; their chemical, physical and biological proporties*, Racolta di publicazione chimice, II, 235 (1956).
3. Bianchini P., Osidea B., *Studi su alcune sostanze eparinoide*, Atti Soc. Lomb. di Science Medico-Biologiche, **13**, 1 (1958).
4. Bianchini P., *A new heparinoid compound*, Patent englez nr. 889010 (1957).
5. Curri S. B., *Histochimia mucopolizaharidelor*, St. cerc. biochim., **6**, 325 (1963).

ST. CERC. BIOCHIM., 9, 1, 49 – 56 (1966)

ACȚIUNEA MUCOPOLIZAHARIDELOR DIN ȚESUTURILE TRACTULUL DIGESTIV ASUPRA METABOLISMULUI LIPIDIC

I. A. MOLNAR, M. SIMIONOVICI, EUGENIA TUCICOV, C. M. GEORGESCU și JEANETTE WINTER

547.963.1

Rezumat. — În lucrare se prezintă rezultatele experimentărilor efectuate în vederea evidențierii acțiunii antilipidice a sulfomucopolizaharidelor acide (S—MPZ-acide) din diferitele țesuturi ale tractului digestiv, recurgîndu-se în acest scop la inhibarea de către S—MPZ extractive a hiperlipemiei și hipercolesterolemiei produse la șobolani prin administrare intravenoasă de Triton A-20 (poli-oxietilen-*p*-izooctil-fenol).

Rezultatele obținute privitor la acțiunea antilipidică a S—MPZ extrase din duoden total de bovine și porcine, mucoasă duodenală de porcine, intestin subțire total de bovine și porcine, mucoasă intestinală de bovine, mucoasă de intestin subțire de porcine, stomac de porcine și rumen de bovine arată un efect protector net împotriva hiperlipidemiei tritonice, care se cifrează între 22 și 78%. În cea mai mare parte din cazuri, rezultatele sînt asigurate statistic.

Se evidențiază astfel faptul că S—MPZ din țesuturile studiate au proprietăți antilipidice. Toate S—MPZ extractive cercetate au acțiune anticoagulantă slabă (corespunzătoare la 3—16 μ heparină pe mg S—MPZ). Efectul puternic antilipidic și acțiunea redusă anticoagulantă îndreptățesc întrebuințarea S—MPZ din țesuturile tractului digestiv în terapeutica hiperlipidemiilor.

Pornind de la observația lui Hahn (1943) asupra puterii clarifiante a heparinei [17] și de la o serie de constatări care atestă intervenția sulfomucopolizaharidelor acide (S—MPZ) în metabolismul lipidic, mai ales asupra celor trei componente principale ale bolii ateromatoase: clearing factor, modificări ale lipoproteinelor serice și alterările peretelui vascular [3], [15], [27], s-a introdus în terapeutica tulburărilor metabolismului lipidic heparina. Întrebuințarea ei era însă limitată de slaba acțiune la administrare orală și de acțiunea anticoagulantă — nedorită în acest caz — la administrare parenterală.

O dată cu stabilirea prezenței S—MPZ în sucul gastric și în mucoasa stomacală și duodenală [4], [5], [9], [10], [11], [12], [13], [14], [24] și cu evidențierea puternicei lor acțiuni normalizatoare asupra schimburilor lipidice [4], [5], [12], [21], [22], au apărut în terapeutică heparinoi-

dele S—MPZ de origine animală sau de sinteză. Heparinoidele se bucură de avantajul eficacităţii orale şi al unei reduse activităţi anticoagulante.

În lucrarea de faţă prezentăm rezultatele cercetărilor noastre asupra acţiunii S—MPZ acide, obţinută de unii dintre noi din diferitele porţiuni ale tractului digestiv de bovine şi porcine [19], [20], în hiperlipidemia experimentală la şobolan, produsă prin administrare de triton (polioxietilen-*p*-izooctilfenol).

Acţiunea hiperlipidică a tritonului (WR 1339 Serva A_{20}), substanţă printre altele cu proprietăţi tensioactive, a fost evidenţiată şi cercetată de numeroşi autori [1], [2], [7], [8], [15], [16], [18], [25], [26]. Tritonul determină la administrare i.v. sau i.p. o creştere a sintezei colesterolului în ficat, interferînd în acelaşi timp cu factorii care distrug lipoproteinele serice, acţiuni ce au ca urmare o creştere a lipemiei totale şi a colesterolemiei. Hiperlipidemia tritonică a fost folosită în scopul evidenţierii acţiunii antilipidice a S—MPZ acide de către Garattini [15] şi Paoletti [22]

MATERIAL ŞI METODE

Pentru determinarea acţiunii antilipidice a S—MPZ acide din ţesuturile tractului digestiv, s-au folosit loturi de minimum 8 şobolani masculi, adulţi, în greutate de 300±25 g, supuşi la post cu apă timp de 24 de ore. După 24 de ore, animalele au primit : lotul 1 cîte o injecţie i.v. dintr-o soluţie de triton 25% în apă distilată, în doză de 500 mg/kg, volumul de administrare fiind de 0,2 ml/100 g corp ; lotul 2 cîte o injecţie i.v. de triton în aceleaşi condiţii ca mai sus, la care s-a adăugat o injecţie i.p. dintr-o suspensie de MPZ astfel preparată, încît fiecare animal să primească 33 mg/kg S—MPZ acide (cu un conţinut de 32% acid hexuronic) [19], volumul de administrare fiind de 1 ml/100 g corp ; lotul 3 îl constituie animalele martor netratate, la care s-a determinat valoarea normală a constantelor lipidice.

După administrarea tritonului şi S—MPZ acide, animalele s-au menţinut în continuare la post cu apă încă 18 ore, după care s-au sacrificat pentru prelevarea sîngelui. Sîngele s-a recoltat pe citrat şi s-a centrifugat. În plasma astfel obţinută s-au determinat densitatea optică, lipemia totală şi colesterolemia.

Densitatea optică a plasmei a fost determinată fotometric, la filtruî S 610, citirile efectuîndu-se faţă de apă distilată.

Lipemia totală a fost determinată după metoda Bloor modificată [6], faţă de o curbă standard stabilită cu tributirină.

Colesterolemia totală a fost determinată după metoda Lieberman şi Bouchard [6], faţă de o curbă standard de colesterol.

Pentru fiecare determinare în parte s-a calculat procentual efectul de împiedicare a hiperlipidemiei tritonice, după următoarea formulă :

$$E\ \% = 100 - \frac{T - C}{I - C} \times 100$$

în care :

E % = efectul procentual,

T = valoarea medie obţinută la animalele protejate cu S-MPZ acide (valoarea extincţiei, lipide totale, colesterol),

C = valoarea medie obținută la animalele martor netratate,

t = valoarea medie obținută la animalele care au primit numai triton.

Calculul conținutului lipidic al plasmei s-a făcut după următoarea formulă :

$$L\ \% = 100\ \frac{E \cdot 10}{0{,}40 \cdot 0{,}082}$$

în care :

L % = mg de lipide totale la 100 ml de plasmă,

E = valoarea extincției citite la fotometru,

0,40 = extincția corespunzătoare la 10 mg de tributirină,

0,082 = cantitatea de plasmă luată în lucru (0,1 ml), din care s-a scăzut cantitatea de citrat de sodiu adăugată la prelevare.

Calculul conținutului în colesterol al plasmei s-a făcut după următoarea formulă :

$$C\ \% = 100\ \frac{E}{0{,}64 \cdot 0{,}415}$$

în care :

C % = mg de colesterol la 100 ml de plasmă,

E = valoarea extincției citite la fotometru,

0,64 = extincția corespunzătoare la 1 mg de colesterol,

0,415 = cantitatea de plasmă luată în lucru (0,5 ml), din care s-a scăzut cantitatea de citrat de sodiu adăugată la prelevare.

Rezultatele au fost prelucrate prin calcul statistic (eroarea standard, precizia determinării și testul de semnificație Student).

Determinarea activității anticoagulante a produselor cercetate de noi s-a efectuat pe plasmă de pisică, în comparație cu heparină standardizată. Activitatea anticoagulantă s-a exprimat în unități de heparină pe mg S—MPZ acide.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

În încercări preliminare, făcute în scopul alegerii dozei optime de triton care urma să fie întrebuințată pentru producerea hiperlipidemiei la șobolan, am putut constata că tritonul Serva A_{20}, administrat intravenos, determină o creștere a lipidelor și a colesterolului plasmatic, precum și a valorii densității optice, de cca. 4—5 ori față de animalele martor normale, precum și că, în condițiile de lucru adoptate de noi, doza de 500 mg/kg corp asigură o hiperlipidemie suficient de ridicată ca să permită evidențierea semnificativă a efectului antilipidic.

Rezultatele cercetărilor noastre pe hiperlipidemia tritonică la șobolan, arătate în tabelele 1 și 2, evidențiază acțiunea antilipidică a S—MPZ acide, obținute din stomacul, duodenul și intestinul subțire de bovine și porcine.

Dacă Bianchini [4], [5] pune în evidență și stabilește acțiunea antilipidică a unui S—MPZ acid izolat din duoden de porcine, iar Cantone [9] izolează o polizaharidă din mucoasa gastrică de porcine, cercetările noastre

Tabela 1

Efectul antilipemic al S—MPZ acide din diferite porţiuni ale tractului digestiv de bovine şi porcine

A. *Densitatea optică*

S—MPZ acide din	Tratament şi număr de animale		Valoarea extincţiei	P	Efect protector (%)
Intestin subţire total de porcine	Triton	9	0,83±0,26		
	Triton + MPZ	9	0,46±0,04	< 0,01	58,7
Musculoasă de intestin subţire de porcine	Triton	8	0,99±0,15		
	Triton + MPZ	8	0,37±0,01	< 0,01	78,6
Duoden total de porcine	Triton	8	0,89±0,09		
	Triton + MPZ	8	0,44±0,07	< 0,01	63,2
Mucoasă duodenală de porcine	Triton	18	0,82±0,01		
	Triton + MPZ	15	0,46±0,02	< 0,01	59,0
Intestin subţire total de bovine	Triton	8	0,95±0,08		
	Triton + MPZ	8	0,43±0,05	< 0,01	69,0
Mucoasă de intestin subţire de bovine	Triton	27	0,76± 0,04		
	Triton +MPZ	27	0,45±0,04	< 0,01	55,4
Duoden total de bovine	Triton	23	1,02±0,08		
	Triton + MPZ	22	0,54± 0,18	< 0,01	59,5
Rumen de bovine şi stomac de porcine	Triton	15	0,91±0,11		
	Triton + MPZ	15	0,72±0,19	< 0,20	27,7

B. *Lipemie totală*

S—MPZ acide din	Tratament şi număr de animale		Lipide mg/100 ml	P	Efect protector (%)
Intestin subţire total de porcine	Triton	8	7422±622		
	Triton + MPZ	8	4754±376	< 0,02	41,5
Musculoasă de intestin subţire de porcine	Triton	8	3615±383		
	Triton + MPZ	8	2433±182	< 0,01	43,1
Duoden total de porcine	Triton	8	6494±391		
	Triton + MPZ	8	2914±557	< 0,01	65,0

Tabela 1 (continuare)

S-MPZ acide din	Tratament și număr de animale		Lipide mg/100 ml	P	Efect protector %
Mucoasă duodenală de porcine	Triton	20	4531±430		
	Triton + MPZ	21	3310±367	< 0,02	34,6
Intestin subțire total de bovine	Triton	8	5144±416		
	Triton + MPZ	8	3369±406	< 0,01	42,9
Mucoasa de intestin subțire de bovine	Triton	24	5440±432		
	Triton + MPZ	24	3059±236	< 0,01	54,6
Duoden total de bovine	Triton	32	5070±119		
	Triton + MPZ	32	3123±248	< 0,01	48,0
Rumen de bovine și stomac de porcine*	Triton	15	5799±615		
	Triton + MPZ	11	4572±530	< 0,20	25,4

* Produsul a fost obținut din amestec de rumen de bovine și stomac de porcine.

arată S—MPZ acide cu acțiune antilipidică atît în intestinul total de porcine și bovine, cît și în componentele lor (musculoasă, mucoasă). De asemenea au fost puse în evidență S—MPZ acide active în stomacul de porcine și rumenul de bovine. În ceea ce privește acțiunea antilipidică a acestor mucopolizaharide, efectul protector față de hiperlipidemia tritonică variază între 22 și 78%.

Experimentările noastre confirmă ipotezele după care S—MPZ acide intervin în metabolismul lipidic pe două căi : asupra colesterolului (împiedicînd acțiunea de creștere a sintezei hepatice, determinată de triton) și asupra lipidelor sanguine (interferînd cu tritonul în acțiunea lui asupra fracțiunilor lipidice ale lipoproteinelor serice). Aceste două acțiuni, antilipemică și anticolesterolemică, concurează la obținerea unui puternic efect de normalizare a tulburărilor schimburilor lipidice. Mecanismul intim de acțiune nu este încă cunoscut. Probabil că S—MPZ își exercită acțiunea în funcție de structura polizaharidică asemănătoare multor factori naturali care intervin în metabolismul lipidic, punînd la dispoziția organismului mucopolizaharide naturale ușor asimilabile, care în cursul tulburărilor metabolismului lipidelor sînt deficitare.

După datele din literatură, S—MPZ acide (heparinoidele tractului digestiv) au activitate anticoagulantă corespunzătoare la 40—50 de unități de heparină pe mg MPZ [6]. Cercetările noastre arată că produsele experimentate au o activitate anticoagulantă mult mai redusă, corespunzătoare la 3—16 unități heparină pe mg (tabela 3). Activitatea anticoagulantă este proprie S—MPZ acide, deoarece într-o altă lucrare [20] am demonstrat electroforetic că aceste produse nu conțin heparină.

Tabela 2

Efectul anticolesterolemic al S—MPZ acide din diferite porţiuni ale tractului digestiv de bovine şi porcine

S—MPZ acide din	Tratament şi număr de animale		Colesterol mg/100 ml	P	Efect protector (%)
Intestin subţire total de porcine	Triton	8	274±27	< 0,20	22,8
	Triton + MPZ	9	227± 12		
Musculoasă de intestin subţire total de porcine	Triton	8	264±18	< 0,10	17,5
	Triton + MPZ	8	224±8		
Duoden total de porcine	Triton	8	294±20	< 0,01	56,4
	Triton + MPZ	7	161±37		
Mucoasă duodenală de porcine	Triton	20	278±5	< 0,01	39,0
	Triton + MPZ	26	192±10		
Intestin subţire total de bovine	Triton	8	226±43	< 0,01	43,0
	Triton + MPZ	8	154±43		
Mucoasă de intestin subţire de bovine	Triton	28	212±5	< 0,01	60,0
	Triton + MPZ	28	120±7		
Duoden total de bovine	Triton	32	280±9	< 0,01	45,0
	Triton + MPZ	32	180±6		
Rumen de bovine şi stomac de porcine	Triton	16	217±11	< 0,01	39,7
	Triton + MPZ	13	154±14		

Tabela 3

Acţiunea anticoagulantă a S—MPZ acide din tractul digestiv de bovine şi porcine. (Unităţi de heparină pe mg S—MPZ acide)

S—MPZ acide din	Activitate anticoagulantă (unităţi/mg)
Intestin subţire total de porcine	11,0
Musculoasă de intestin subţire de porcine	7,5
Duoden total de porcine	10,2
Mucoasă duodenală de porcine	16,5
Intestin subţire total de bovine	6,0
Mucoasă de intestin subţire de bovine	3,0
Duoden total de bovine	9,6
Rumen de bovine şi stomac de porcine	7,0

Înalta activitate antilipidică a S—MPZ acide din tractul digestiv și redusa lor activitate anticoagulantă justifică întrebuințarea lor în terapeutica hiperlipidemiilor.

Prezentată la redacție la 6 iulie 1965

Institutul de cercetări chimico-farmaceutice, București

BIBLIOGRAFIE

1. Ballardini E., Paoletti P., Paoletti R., *Effect of Triton on the biosyntesis of liver lipides from diferent precursors*, Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., **34**, 1 413 (1958).
2. Berg G., Schön H., *The action of protein and protein bound carbohydrates in serum after the administration of a wetting agent*, Blut, **5**, 297 (1959).
3. Bianchini P., *Inibizione in vitro del fattore chiarificante plasmatico post-eparinico*, Il Farmaco (Ed. St.), **18**, *11*, 839 (1963).
4. Bianchini P., *Su un eparinoide della mucosa duodenale*, Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., **34**, 685 (1958).
5. Bianchini P., *Attivita lipolitiche di un eparinoide della mucosa duodenale*, Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., **34**, 688 (1958).
6. Bianchini P., *Heparinoid anticholesterolemic factor*, Brevet englez, 889 010 (1957).
7. Byers S. O., Friedman M., Omoto C., Hayashi W., Wang B., Sugiyama T., *Site of origin of plasma triglyceride*, Am. J. of Physiol., **198**, 629 (1960).
8. Byers S. O., Cady P., Friedman M., Felton L., *Effect of Triton on triolein-iodine* ^{131} *distribution in artherosclerotic rabbit tissues*, Am. J. Physiol., **197**, 1053 (1959).
9. Cantone A., Cresseri A., Piccini F., *Azione antilipemica e antisteatosi epatica alimentare di un preparator mucinico della mucosa gastrica di maiale e di una frazione aminopolizaharidica acida da esso isolato*, Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., **32**, 69 (1956).
10. Capraro V., Cantone A., Cresseri A., *Azione chiarificante del plasma indotta con somministrazione orale di frazioni muciniche, della mucosa gastrica di maiale*, Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., **30**, 1 381 (1954).
11. Capraro V., Cantone A., Piccini F., Cresseri A., *Sull'azione chiarificante e lipotropa di una frazione mucinica del succo gastrico umano*, Atti Soc. Lomb. Sc. Med. Biol., **12**, *2*, 249 (1957).
12. Cocucci M., Rizzi F., *Su una sostanza ad azione ipocolesterolemiante e ipolipemizzante*, Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., **34**, 810 (1958).
13. Cresseri A., *Osservazioni sulle caracteristiche biologiche e chemiche di frazioni mucoproteiche ottenute della mucosa gastrica di maiale*, Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., **30**, 718 (1954).
14. Cresseri A., *Individuazione e isolamento di taluno componenti presenti in un preparato mucinico da mucosa gastrica di maiale, loro proprieta chimiche, fisiche e biologiche*, Inst. C. Erba, Racolta di publ. chem. biol. med., **2**, 235 (1956).
15. Steinberg D., *Chemoterapeutic approaches to the problem of hiperlipidemia*, în Garattini S., Shore P., *Advances in Pharmacology*, Academic Press, New York, 1962, **1**, 59.
16. Ginoulhiac E., *Behavior of the lipides of blood serum and liver of the rat poisoned with triton and under treatment with 3 pyridin acetic acid*, C. A. **55**, 23 824 f (1961).
17. Hahn P. F., *Abolishment of alimentary lipemia following injection of heparin*, Science **98**, 19 (1943).
18. Koba Tadayuki, *Lipides metabolism.* VIII. *Hipercholesterolemia.* Hipercholesterolemic action of triton W. R. 1339, C. A. **55**, 14 709 d (1961).
19. Molnar I. A., Winter J., Tucicov E., Pelloni V., Uricaru N., *Mucopolizaharide din diverse țesuturi ale tractusului digestiv*, St. cerc. biochim., **9**, 33 (1966).
20. Molnar I. A., Winter J., *Studiu electroforetic și metacromatic al mucopolizaharidelor din țesuturile tractusului digestiv*, St. cerc. biochim., **9**, 39 (1966).
21. Nicrosini F., Piccinelli O., Del Favero A., Pasotti A., Ricotti V., *L'aterosclerosi sperimentale colesterinica nel coniglio. Azione di un eparinoide duodenale*, Il Farmaco (Ed. Pr.), **16**, 511 (1961).

22. Paoletti R., *Comparation studies on hypocholesterolemic agents*, Amer. J. clin. Nutr., **10**, 270 (1962).
23. Phocas E., Charbonnier A., Wolff R., *Le facteur clarifiant post heparine du plasma dans les affections hepatiques*, Biol. et Path. (Sem. Hôp.), *9—10*, 797 (1962).
24. Salvetti F., Rizzi F., Streco M., *Demonstrazione dell' azione chiarificante sul plasma umano della mucoproteine glandulare di Glass*, Atti Soc. Lomb. Sci. Med. Biol., **10**, 341 (1955).
25. Scanu A., Pasquale O., *Triton hiperlipemia in dogs. I. In vitro effects on the deteryent in serum lipoproteins and chylomicroms*, J. exp. Med., **113**, 735 (1961).
26. Scanu A., Pasquale O., *Triton hiperlipemia in dogs. II. Atheroscleroses difuse lipidosis and depletion of fat stores produced by prolonged administration of the monionic surface active agent*, J. exp. Med., **114**, 279 (1961).
27. Soru E., *Biochimie medicală*, vol. I, Edit medicală, Buc., 1959.

ST. CERC. BIOCHIM., 9, 1, 57 – 65 (1966)

INFLUENȚA ENZIMELOR PECTOLITICE ALE MUCEGAIURILOR ASUPRA COMPLEXULUI ENZIMATIC AL STRUGURILOR

DUMITRU MOȚOC și BRAD SEGAL

577.15

Rezumat. — S-au izolat de pe struguri alterați 16 tulpini de *Botrytis cinerea*, 15 de *Penicillium glaucum* și 12 de *Aspergillus glaucus*. În urma analizei activității enzimatice, s-a constatat că acestea posedă un complex enzimatic în care predomină enzimele hidrolitice, în special pectinazele și citazele, activitatea cea mai puternică determinîndu-se la *Botrytis cinerea*. Avînd în vedere că *Botrytis cinerea* este mucegaiul care atacă în cea mai mare măsură atît strugurii pe butuc, cît și în timpul păstrării, se poate trage concluzia că există o strînsă corelație între fitopatogenie și activitatea pectolitică a mucegaiurilor, asemănătoare cu cea stabilită de alți autori în cazul bacteriilor.

Sub acțiunea enzimelor pectolitice de natură fungică, se constată eliberarea polifenoloxidazei existente în struguri în stare legată și, ca urmare, intensificarea activității ei. Autorii consideră că reacția de imunitate a plantelor, care în mod obișnuit este caracterizată de intensificarea proceselor de respirație, este declanșată de pătrunderea enzimelor hidrolizante ale parazitului în țesuturi.

În numeroase lucrări se subliniază rolul enzimelor pectice secretate de către microorganisme în îmbolnăvirea plantelor. Este un fapt cunoscut că majoritatea mucegaiurilor fitopatogene au o activitate pectolitică însemnată [6], [7]. După Brown [1], putrezirea țesuturilor interioare, provocată de fermenți facultativi de tip *Botrytis cinerea*, depinde de acțiunea pectinazei, care are o importanță deosebită în macerarea țesuturilor și în intoxicarea celulelor. La aceleași concluzii ajung Scheffer și Walker [21], Waggoner și Dimond [28], Tribe [24], Nelson [12] și alții. Șișelova [23] arată că acțiunea patogenă a bacteriilor fitopatogene se corelează cu acțiunea lor pectolitică.

MATERIAL ȘI METODE

S-au studiat 16 tulpini de *Botrytis cinerea*, 15 de *Penicillium glaucum* și 12 de *Aspergillus glaucus*, izolate de pe struguri alterați.

Mucegaiurile izolate au fost dezvoltate pe un mediu steril format din 4 părți tărîțe, 1 parte morcovi proaspeți, 16 părți apă, recomandat de Vasilescu [27] și de alți autori ca optim pentru obținerea enzimelor pectolitice. După incubare timp de 4 zile la 35°C, miceliul format a fost uscat în curent de aer cald, la temperatura de 45°C, pînă la 12% umiditate.

Activitatea enzimelor pectolitice s-a determinat în funcție de reducerea viscozității unei soluții de 2% pectină farmaceutică, avînd 74% grupări metoxilice și 5,4% cenușă. Poligalacturonaza s-a determinat iodometric, iar pectinmetilesteraza prin titrarea cu NaOH 0,1 N a grupărilor carboxil puse în libertate [26].

Citazele s-au determinat după metoda descrisă de Lyr și Novak [8], prin determinarea zahărului reducător format în urma hidrolizei xilanului.

Proteinazele s-au studiat prin măsurarea capacității de reducere a viscozității unei soluții de 8% gelatină [9].

Enzimele oxidante (polifenoloxidaza, peroxidaza și ascorbinoxidaza) s-au determinat în funcție de oxidarea unei soluții de acid ascorbic în condiții stabilite [13].

Pentru glucozoxidaza s-a folosit metoda descrisă de Underkoffler [25], care constă în titrarea acidului gluconic format în urma oxidării glucozei.

Rezultatele expuse în tabele reprezintă media a cîte trei determinări.

1. ACTIVITATEA PECTOLITICĂ A MUCEGAIURILOR IZOLATE DE PE STRUGURI

În urma determinării activității pectolitice a tulpinilor de mucegai izolate de pe struguri se constată că toate tulpinile au o activitate ridicată. Variațiile din cadrul aceleiași specii sînt strînse, dar deosebiri se constată de la o specie la alta.

Din tabela 1 se observă că, dintre cele trei specii de mucegaiuri izolate de pe struguri, *Botrytis cinerea* are acțiunea pectolitică cea mai puternică (reduce în cea mai mare măsură viscozitatea inițială a soluției de pectină). Avînd în vedere că *Botrytis cinerea* este mucegaiul care atacă cel mai puternic strugurii, atît pe butuc, cît și în timpul păstrării, din determinările noastre se poate trage concluzia că și în cazul mucegaiurilor,

Tabela 1

Limitele activității pectolitice a mucegaiurilor izolate (soluție de pectină 2%, 0,2 preparat uscat, temperatura 40°C, pH 4,2)

Soiurile de struguri	Reducerea viscozității soluției de pectină la % față de inițial		
	B. cinerea	*P. glaucum*	*A. glaucus*
Chasselas doré	38,9+37,1	60,2+46,3	54,3+45,4
Muscat Hamburg	42,5	57,2+52,4	52,8+50,8
Afuz-ali	35,2	44,3	—
Coarnă albă	37,8+33,4	43,4+44,8	44,4+43,2
Coarnă neagră	38,1+34,5	48,2+47,6	44,2+40,2
Crîmpoșie	37,6+34,8	45,5+43,2	—

ca și în cazul bacteriilor, există o corelație între acțiunea fitopatogenă și activitatea pectolitică.

Soiul de struguri de pe care s-a izolat mucegaiul influențează în mai mică măsură activitatea pectolitică decît specia de mucegai. Se remarcă în mod special că toate tulpinile de mucegai izolate de pe soiurile Coarnă albă, Coarnă neagră și Crîmpoșie au acțiunea pectolizantă cea mai ridicată. Într-o lucrare anterioară s-a arătat că aceste soiuri au un conținut ridicat în substanțe pectice (11), de unde se poate trage concluzia că în oarecare măsură are o influență și conținutul de substanțe pectice din strugurii de pe care s-a izolat mucegaiul.

2. INFLUENȚA ACTIVITĂȚII ENZIMATICE A MUCEGAIURILOR ASUPRA COMPLEXULUI ENZIMATIC AL STRUGURILOR

Rolul diferitelor sisteme enzimatice în procesul de alterare a fructelor și legumelor a constituit obiectul unor studii aprofundate [15]. Pentru a lămuri interacțiunea sistemelor enzimatice în procesul de infecție a strugurilor, s-a determinat în tulpinile izolate activitatea principalelor enzime de hidroliză și oxidoreducere și s-a comparat cu aceea a sursei pectolitice de *Aspergillus niger* I.C.A.

Din tabela 2 se constată că mucegaiurile izolate de pe struguri se caracterizează printr-un echipament puternic de enzime hidrolizante și de oxidoreducere. Se evidențiază în mod deosebit conținutul în enzime pectolitice și citaze, care după cum se știe joacă un rol deosebit în procesul de infecție.

Tabela 2

Complexul enzimatic al mucegaiurilor izolate de pe struguri

Enzimele determinate	Unit. măs.	*B. cinerea*	*P. glaucum*	*A. glaucus*	*A. niger*
Poligalacturonază	UPG	68,2	51,6	50,1	69,4
Pectinesterază	UPE	15,2	25,3	21,6	21,4
Citază	mg ZR	103,4	97,0	89,5	114,5
Proteinază	%	38,7	31,0	32,4	47,3
Polifenoloxidază	mg AA	52	48	69	—
Peroxidază	mg AA	72	67	—	82
Ascorbinoxidază	mg AA	23	25	41	—
Glucozoxidază	UGO	4,2	2,1	2,0	2,4

– Toate rezultatele se exprimă la 1 g de preparat uscat.
– Poligalacturonaza se exprimă în unități poligalacturonazice (UPG).
– Pectinesteraza, în unități de pectinesterază (UPE).
– Citazele, în mg zahăr reducător (mg ZR).
– Proteinaza în procente de reducere a viscozității unei soluții de 8% gelatină (%).
– Polifenoloxidaza, peroxidaza și ascorbinoxidaza, în mg de acid ascorbic oxidat (AA).
– Glucozoxidaza, în unități de glucozoxidază (UGO).

Se observă că, dintre toate mucegaiurile izolate, *Botrytis cinerea* are activitatea citolitică cea mai ridicată, ceea ce permite să se facă o legătură și între activitatea citazelor și virulența fitopatogenă.

Pentru a se urmări influența enzimelor existente în mucegai asupra complexului enzimatic al strugurilor, s-au extras enzimele din mucegaiurile uscate și măcinate cu apă, la 40°C, timp de o oră, după care s-a filtrat și extractul s-a adăugat strugurilor zdrobiți din soiul Riesling.

Tabela 3

Influența complexului enzimatic al mucegaiurilor asupra strugurilor

Enzimele determinate	U.M.	Riesling	Riesling + *A. niger*	Riesling + *B. cinerea*	Riesling + *P. glaucus*	Riesling + *A. glaucus*
Poligalacturonaza	UPG	1,8	19,4	18,9	15,7	16,2
Pectinesteraza	UPE	6,3	11,7	8,8	14,7	12,8
Citaza	mg ZR	—	16,7	13,5	10,7	9,8
Proteinaza	%	—	8,4	7,3	6,5	5,7
Polifenoloxidaza	mg AA	40,7	125,9	115,8	105,7	97,5
Peroxidaza	mg AA	8,7	34,3	24,2	25,7	32,6
Ascorbinoxidaza	mg AA	17,5	25,7	25,6	28,9	42,6
Glucozoxidaza	UGO	—	0,5	0,8	0,4	0,4

– Toate rezultatele se exprimă la 1 g de preparat uscat.
– Poligalacturonaza se exprimă în unități poligalacturonazice (UPG).
– Pectinesteraza, în unități de pectinesterază (UPE).
– Citazele în mg de zahăr reducător (mg ZR).
– Proteinaza în procente de reducere a viscozității unei soluții de 8% gelatină (%).
– Polifenoloxidaza, peroxidaza și ascorbinoxidaza în mg de acid ascorbic oxidat (AA).
– Glucozoxidaza în unități de glucozoxidază (UGO).

Din tabela 3 se constată că strugurii din soiul Riesling au, comparativ cu mucegaiurile, enzime hidrolitice mult mai puțin active, în schimb conțin enzime oxidante puternice, între care predomină polifenoloxidaza. Datorită activității enzimatice hidrolitice deosebit de puternice a mucegaiurilor, adăugarea chiar în cantități mici a extractului influențează puternic activitatea enzimatică a strugurilor. În majoritatea cazurilor, cu excepția enzimelor oxidante, se constată o creștere a activității enzimatice a strugurilor zdrobiți , proporțională cu cantitatea de enzime introdusă o dată cu extractul.

În cazul enzimelor oxidante, creșterea activității enzimatice este cu mult mai mare și complet anormală. La strugurii zdrobiți cărora li s-a adăugat extract obținut din *Aspergillus niger*, extract în care nu s-a identificat polifenoloxidaza, se observă o creștere chiar mai accentuată a acestei enzime decît în cazul cînd s-a adăugat extract din *Botrytis cinerea*, care conține polifenoloxidază. Deoarece extractul obținut din *Aspergillus niger* are o activitate pectolizantă mai puternică decît cel din *Botrytis cinerea*,

se poate trage concluzia că intensificarea activității enzimelor oxidante poate fi mai degrabă corelată cu activitatea pectolizantă a preparatului respectiv decît cu prezența sau cu absența enzimelor oxidante.

3. INFLUENȚA EXTRACTULUI ENZIMATIC DIN MUCEGAIURILE CE SE DEZVOLTĂ PE STRUGURI ASUPRA ACTIVITĂȚII ENZIMELOR DE OXIDARE A STRUGURILOR

Cercetările efectuate de Sisakian [20], Durmișidze [3, 4], Rodolupo [14] și Creuss [2] au arătat că enzimele oxidante din struguri se găsesc în mică măsură în stare liberă în suc, într-o proporție de 3—10 ori mai mare găsindu-se în stare legată în pulpă.

Determinările făcute de noi la 4 soiuri de struguri (Riesling, Galbenă, Plăvaie și Fetească) au arătat că activitatea polifenoloxidazei este mult mai redusă în sucul obținut prin presare decît în tescovina rezultată în urma presării. Determinarea polifenoloxidazei s-a făcut atît la pH-ul natural al strugurilor, cît și la pH 7, fiind pH-ul optim de acțiune a enzimei.

Tabela 4

Activitatea polifenoloxidazei a diferitelor soiuri de struguri

Soiul de struguri		Activitatea polifenoloxidazei exprimată în mg de acid ascorbic la 1 g de substrat pentru			
		Suc de la presă		Tescovină	
		pH natural	pH 7	pH natural	pH 7
Riesling	(pH = 3,0)	3,7	25,6	11,3	89,7
Galbenă	(pH = 2,8)	2,8	20,4	8,2	79,5
Plăvaie	(pH = 2,7)	2,4	21,3	9,5	67,5
Fetească	(pH = 3,1)	3,5	30,7	12,7	77,2

Din tabela 4 se constată că activitatea polifenoloxidazei are valori diferite în funcție de soiul de struguri, pH-ul la care acționează și părțile componente ale strugurilor. Activitatea polifenoloxidazei din suc este mai ridicată la soiul Riesling, pe cînd în tescovină, la soiul Fetească, diferențele sînt relativ mici între soiurile cercetate. Ceea ce iese în evidență, este activitatea mult mai ridicată a polifenoloxidazei din tescovină față de suc.

Avînd în vedere că enzimele oxidante din struguri se găsesc în cea mai mare măsură în stare legată, se poate considera că activizarea enzimelor oxidante prin adăugarea extractelor are loc datorită faptului că enzimele pectolitice, prin macerarea țesutului, pun în libertate enzimele care se găsesc în stare legată. Pentru confirmarea acestor presupuneri, s-au îndepărtat prin centrifugare părțile de pulpă existente în mustul rezultat de la presare. Activitatea polifenoloxidazei s-a determinat în sucul centrifugat și în tescovină, folosindu-se adaos de extract de *Aspergillus niger* și de *Botrytis cinerea*. S-au ales aceste două preparate, deoarece,

după cum s-a arătat, *Botrytis cinerea* conține polifenoloxidază, pe cînd *Aspergillus niger* nu conține, ceea ce dă posibilitatea de a se pune în evidență măsura în care influențează enzimele oxidante ale mucegaiurilor.

Din tabela 5 se evidențiază faptul că, în cazul sucului centrifugat din care pulpa a fost îndepărtată, nu există o diferență netă între proba martor și proba tratată cu extract enzimatic. În reziduul rezultat de la centrifugare și în tescovină, activitatea polifenoloxidazei probelor tratate

Tabela 5

Influența preparatelor enzimatice de *A. niger* și *B. cinerea* asupra activității polifenoloxidazei strugurilor din soiul Riesling

Proba	Activitatea polifenoloxidazei exprimată în mg de acid ascorbic la 1 g de substrat					
	Suc centrifugat		Sediment		Tescovină	
	pH 2,9	pH 7	pH 2,9	pH 7	pH 2,9	pH 7
Martor	—	15,2	8,3	66,7	20,4	123,4
Martor + *A. niger*	—	16,2	15,7	148,9	35,4	374,5
Martor + *B. cinerea*	—	19,7	17,8	160,5	30,4	366

crește într-o măsură foarte mare. Este interesant de remarcat că în cazul sucului centrifugat, care are o slabă acțiune polifenoloxidazică, proba tratată cu extract de *Botrytis cinerea*, care conține polifenoloxidază, indică o cantitate mai mare de acid ascorbic oxidat decît proba tratată cu *Aspergillus niger*, la care polifenoloxidaza nu este prezentă. La probele de tescovină, în care se găsește o cantitate mare de polifenoloxidază legată, activitatea oxidantă este mai mare la probele tratate cu extract de *Aspergillus niger*, a cărui acțiune pectolitică este mai puternică. În consecință, se poate admite că există o corelație între activitatea pectolitică a mucegaiurilor și intensificarea activității enzimelor de oxidare a strugurilor, deoarece enzimele pectolitice, provocînd macerarea țesutului, pun în libertate enzimele oxidante care se găsesc în stare legată.

DISCUȚII

Este un fapt cunoscut și general admis că, în cazul infectării cu microorganisme, majoritatea plantelor își măresc intensitatea respirației și, în mod direct, activitatea enzimelor oxidante.

Activizarea polifenoloxidazei este constatată de Rubin, Arțihovskaia și Proskurnikova [16] la cartofii atacați, de Rubin și Bolovieva [17] la bumbacul atacat de *Verticillium*, de Handobina și Ozerețkovskaia [5] la morcovii atacați de *Phoma rostrupii*. Sanwal [19] comunică despre activizarea polifenoloxidazei și peroxidazei la tomatele atacate de *Fusarium lycopersicae*. Lucrările lui Rubin, Cetverikova și Arțihovskaia [18] au lămurit faptul că activitatea enzimelor oxidante în cazul infecțiilor cu microorganisme are la bază creșterea intensității activității enzimelor

plantei-gazdă, ca urmare a pătrunderii toxinelor secretate de microorganisme.

În urma cercetărilor efectuate de noi cu extracte enzimatice asupra strugurilor și bazați pe vastul material din literatură, putem trage concluzia că reacția de imunitate este declanșată de enzimele hidrolizante, și în special de enzimele pectolitice ale microorganismelor. După cum s-a arătat, fiecare microorganism patogen conține enzime pectolitice și există o proporționalitate directă între virulența sa și activitatea pectolitică. Microorganismele folosesc enzimele pectolitice în primele etape ale procesului de infecție, la dezintegrarea țesutului plantelor, pentru a le distruge imunitatea și pentru a realiza o mai bună asimilare a substanțelor nutritive. Se știe că sinteza enzimelor pectolitice în mucegaiuri are loc cu intensitate în primele 2—4 zile, după care, din momentul formării sporilor, ea scade rapid [22]. Concomitent cu macerarea țesutului are loc și punerea în libertate a enzimelor oxidante ce se găsesc în celulele plantelor în stare legată. Este interesant de remarcat că atît enzimele oxidante (polifenoloxidaza, peroxidaza și ascorbinoxidaza), cît și polifenolii se găsesc concentrați în pielița strugurilor.

Faptul că polifenoloxidaza se găsește în cea mai mare măsură în stare legată ne determină să tragem concluzia că polifenoloxidaza nu are un rol important în procesele de respirație normale ale plantelor. Mihlin [10] dă chiar o mai mare importanță în respirație acidului dioximaleic decît polifenolilor, deoarece produsul său de oxidare, dicetona, este mai puțin toxic decît chinonele, produse de oxidare ale polifenolilor care au acțiune nocivă asupra substanțelor proteice.

Rolul enzimelor oxidante cercetate este, pe de o parte, de a oxida substanțele tanante, în vederea obținerii unor substanțe polimerizate care să formeze o barieră în pătrunderea eventuală a microorganismelor (rolul polifenoloxidazei), pe de altă parte de a inactiva enzimele și substanțele toxice secretate de mucegaiuri (rolul peroxidazei). Deoarece aceste enzime se găsesc în cea mai mare parte în stare legată și se pun în libertate în momentul în care infecția începe să se extindă, înseamnă că eliberarea lor trebuie să fie pusă în legătură cu acțiunea enzimelor de macerare ale microorganismelor.

CONCLUZII

Din analiza activității enzimatice a mucegaiurilor *Botrytis cinerea*, *Penicillium glaucum* și *Aspergillus glaucus* izolate de pe strugurii alterați se constată că acestea posedă un complex enzimatic în care predomină enzimele hidrolitice, în special pectinazele și citazele, activitatea cea mai puternică determinînd-o *Botrytis cinerea*. Avînd în vedere că *Botrytis cinerea* este mucegaiul care atacă în cea mai mare măsură atît strugurii pe butuc, cît și în timpul păstrării, se poate trage concluzia că există o strînsă corelație între acțiunea fitopatogenă și activitatea pectolitică a mucegaiurilor, asemănătoare cu cea stabilită de alți autori în cazul bacteriilor.

Intensificarea proceselor de oxidare ca urmare a atacării strugurilor de către mucegaiuri are loc datorită punerii în libertate a polifenoloxidazei legate, de către enzimele pectolitice ale mucegaiului patogen. Se poate considera că reacția de imunitate a plantelor este declanșată de pătrunderea enzimelor hidrolizante ale parazitului în țesuturi.

Prezentată la redacție
la 28 mai 1965

Catedra de microbiologie-biochimie,
Institutul politehnic,
Galați

BIBLIOGRAFIE

1. Brown, W., *On the relation between the „infection drop" and the underlying host tissue*, Ann. Bot., **36**, 399—406 (1916).
2. Creuss, W. V., *Advances in enzimology*, vol. 3, p. 349. Interscience Publishers, Inc. New York, 1945.
3. Durmișidze, S. V., *Dubilnie veșcestva i antoțiani vinogradnoi lozi i vina*, Izd. Akad. Nauk SSSR, Moscova, 1955.
4. Durmișidze, S. V., *Polifenoloxidaza vinogradnov jagod*, Biohimiia, **15**, *1*, 58—60 (1959).
5. Handobina, L. M., Ozereț kovskaia, O.L., *Proțessi okislenija v korneah morkovi, porajennih fomozom*, Biohimiia plodov i ovoșcei, **5**, 131—145 (1959).
6. Kertesz, Z. I., *The Pectic substances*, Interscience Publishers, New York, 1951.
7. Kertesz, Z. I., *The Enzimes*, **I**, Academic Press, New York, 1951, p. 2.
8. Lyr, H., Novak, E., *Vergleichende Untersuchungen über die Bildung von Cellulasen und Hemicellulasen bei einigen Pilzen*, Ztschr. f. allg. Microbiologie, **2**, *2*, 86—98 (1962).
9. Loghinova, L. G., *Ob aktivnosti ghidroliticeskih fermentov u varianta Aspergillus nidulans polucennovo v pomoșciu ultravioletovih lucei*, Mikrobiologhiia, **XXIX**, *5*, 683—689 (1960).
10. Mihlin, D. M., *Biologhiceskoe okislenie*, Izd. A. N. SSSR, Moscova, 1956.
11. Moțoc, D., Segal, Brad, *Studiul biochimic al conservării principalelor soiuri de struguri din R.P.R.*, Sesiunea științifică I.P.G., 1962.
12. Nelson, K. E., *Factors influencing the infection grapes by Botrytis cinerea*, Phytopathology, **41**, *4*, 319—326 (1951).
13. Pavolovțkaia, K. I., Sadenko, D. M., *Metod sovmestnovo opredelenia aktivnosti askorbinoxidazi, polifenoloksidazi i peroksidazi*, Biohimiia, **20**, 88—91 (1955).
14. Rodolupo, A. K., *Okislitelnie fermenti șampanskih sortov vinograda is susla*, Biohimiia vinodelie, **3**, 43—48 (1950).
15. Rubin, B. A., Arțihovskaia, E. V., *Biohimiia i fiziologhiia imuniteta rastenia* Izd. A. N. SSSR, Moscova, 1960.
16. Rubin, B. A., Arțihovskaia, E. V., Praskurnikova, A. T., *Okislitelnie prevrașcenia fenolov i ih rol v javlenijah ustoicivosti kartofelea k Phitophtora infestans*, Biohimiia, **12**, *2*, 141—152 (1947).
17. Rubin, B. A., Bolobueva, N. P., *Aktivnosti polifenoloksidaz tkanei hlopciatnika v sveazi s ustoicivistiu rastenia k gribku Verticilium alboatrum*, Dokl. A. N. SSSR, **79**, *4*, 637—638 (1951).
18. Rubin B. A., Cetverikova E. P., Arțihovskaia, E. V., Okislitelnaia sistema i immuniteta rastenia, J obșcei biologhii, **16**, *2*, 106 —118 (1965).
19. Sanwal, B. D., *Poliphenoloxidase and ascorbic acid oxidase activity in tomato plants infected with Fusarium lycopersici*, Proc. Indian. Acad. Sci., **44**, *5*, 257—270 (1956 a)
20. Sisakean, M. M., Egorov, I., Afrikaean, V., *Biohimiceskoe osobennosti sorta vinogradov*, Biohimia vinodelia, **2**, 7 (1948).
21. Scheffer, R. P., Walker, I. C., *The phisiology of fusarium wilt of tomato*, Phytopatology, **43**, *52*, 116 (1953).
22. Schröder, H., Muller-Stol, W. R., *Über die Pectinasebildung einiger Schimmelpilze und den Einflus von Temperatur and Azidität auf ihn pectolitischen Fermente*, Zeitschrift fur allg. Microbiologie, **2**, *2*, 109—131 (1962).

23. Sișelova, N. A., *Roli protopektinazi v infectionnom proțesse u rastenii*, Mikrobiologhiia, **17**, *3*, 252–261 (1948).
24. Tribe, H. T., *Studies on the physiology of parasitism*, Ann. Bot., **19**, *75*, 351–368 (1955).
25. Underkoffler, L. A., *Glucose Oxidase. Production and Application of Enzyme*. SCI Monograf, **11**, 72, London Society of Chemical Industry, Londra (1963).
26. Vasilescu, I., *Enzimele*, Edit. Acad. R.P.R., București, 1958.
27. Vasilescu, I., *Tehnologia și aplicațiile industriale ale enzimelor*, Edit. tehnică, București, 1963.
28. Waggoner, P. E., Dimon, A., *Production and role of extracellular pectic enzymes of Fusarium oxysporum f. lycopersici*, Phytopatology, **45**, *2*, 79–87 (1955).

ST. CERC. BIOCHIM., 9, 1, 67 – 79 (1966)

REFERATE GENERALE

FIZICO-CHIMIA PROCESELOR ENZIMATICE ŞI IMPORTANŢA LOR PRACTICĂ

L. M. BURUIANĂ

„Procesele chimice ale materiei vii sînt aproape complet dependente de activitatea catalitică a enzimelor, astfel încît problemele privind natura lor şi felul cum acţionează sînt două din cele mai fundamentale ale biochimiei"

F. SANGER
Structure and activity of enzymes, 1964.

577:15:012

Reacţiile chimice au fost atribuite existenţei unor forţe electrostatice care se exercită între atomii elementelor. Celebra dispută dintre J. J. Berzelius şi J. B. Dumas (1830—1850) părea că infirmă rolul acestor forţe în cazul compuşilor organici. Unele reacţii în special respingeau complet orice presupunere despre natura lor electrică. Aşa era cazul degradării amidonului de către malţ (K. S. Kirchoff, 1814), a apei oxigenate de către lichidele biologice (L. Thénard, 1818) etc.

Aceasta l-a făcut pe E. Mitscherlich (1834), elevul lui Berzelius, să dea acestui tip de reacţii specifice de descompunere şi combinare denumirea de reacţii de contact. Termenul nu era prea reuşit, ceea ce l-a determinat pe Berzelius să-l înlocuiască cu acela de reacţii catalitice, subliniind caracteristica lor de a fi provocate de prezenţa unor substanţe ale căror părţi componente nu se găsesc în produsele finale. Cu perspicacitatea lui caracteristică, Berzelius [1] scrise în 1836 : „S-a descoperit că multe dintre corpurile simple şi compuse, în stare solidă şi sub formă de soluţie, posedă capacitatea de a acţiona asupra altora într-un mod special, cu totul diferit de afinitatea chimică obişnuită ; aceasta se manifestă prin faptul că ele provoacă în corpul supus acţiunii lor transformarea acestuia în părţi componente, nefiind de loc necesar ca ele însele să participe la acest proces, deşi uneori se întîmplă şi aşa". Această admirabilă caracterizare a proceselor catalitice este valabilă şi astăzi, iar în ceea ce priveşte enzimele, catalizatorii din materia vie, cea mai satisfăcătoare — deşi incompletă — definiţie

actuală este aceea propusă de M. Dixon şi E. C. Webb [8] „Enzimele sînt proteine cu caracter *catalitic* datorită puterii lor de activare specifică".

După cum se vede, afară de adaosul „activare specifică", definiţia se bazează pe noţiunea introdusă de Berzelius. Cataliza în general şi cataliza enzimatică în special, a constituit, datorită naturii sale neprecise, terenul unor lupte de idei dintre cele mai vii între diferitele curente filozofice. În cele ce urmează vom încerca să rezumăm cunoştinţele actuale cu privire la cinetica şi termodinamica reacţiilor enzimatice.

I. CINETICA REACŢIILOR ENZIMATICE

Explicaţia acţiunii catalitice a enzimelor în cadrul legilor fundamentale ale reactivităţii chimice a preocupat pe numeroşi cercetători. Primul care a încadrat exact reacţiile enzimatice şi a demonstrat experimental acest fapt, printre reacţiile chimice obişnuite, guvernate de legea maselor, a fost V. Henri [12]. Faptul este adesea ignorat, deşi lucrarea lui V. Henri postulează cel puţin două concepte fundamentale cu privire la mecanismul catalizei enzimatice, care stau la baza tuturor prelucrărilor teoretice ale datelor experimentale obţinute în enzimologie. Le citãm din lucrarea lui V. Henri:

1. Viteza de invertire a zaharozei (el a lucrat cu invertaza, emulsina, amilaza) creşte cu concentraţia acesteia, iar de la valoarea mijlocie mai mare de 0,1 M viteza de invertire este aproape independentă de concentraţia în zaharoză.

2. Viteza reacţiei este proporţională cu cantitatea de enzimă.

Pentru a exprima matematic legea care concretizează rezultatele experimentale, V. Henri face ipoteza că între substrat şi enzimă se formează un complex enzimă-substrat. Sub această formă „activă", substratul suferă descompunerea specifică, cu eliberarea enzimei respective, care apoi îşi continuă acţiunea în acelaşi mod. Redăm întocmai raţionamentul lui V. Henri din lucrarea citată, deoarece este pentru prima oară că la explicarea mecanismului de acţiune al enzimelor se aplică o lege fundamentală a cineticii chimice, contrar afirmaţiilor lui E. Duclaux [9], A. J. Brown [2] şi alţii că legea maselor nu ar fi aplicabilă în acest caz.

Să presupunem că avem iniţial o cantitate $(a-x)$ de zaharoză şi o alta x hidrolizată. Adăugînd o cantitate Ø de invertază, o parte se combină cu zaharoza, formînd compusul z, iar o alta cu compuşii de hidroliză, dînd compusul y. O porţiune din enzimă X rămîne liberă. Dacă formarea acestor combinaţii se face în conformitate cu legea maselor, vom avea următoarele relaţii:

$$(1) \qquad (a - x) \cdot X = \frac{1}{m \cdot z}$$

$$(2) \qquad x \cdot X = \frac{1}{n \cdot y}$$

$$(3) \qquad Ø = X + y + z$$

Scoţînd din (1) şi (2) valorile lui y şi z şi introducîndu-le în (3), vom avea:

$$(4) \qquad X = \frac{Ø}{1 + m(a - x) + n.x}$$

m şi n fiind două constante arbitrare, care depind de condiţiile experimentale (temperatură, pH, conc. ionică etc). Mai departe se pot face două ipoteze:

a) sau că enzima liberă X este aceea care acționează asupra substratului, în care caz viteza de hidroliză va fi :

$$\frac{dx}{dt} = L \cdot X(a-x) \tag{5}$$

Înlocuind pe X cu valoarea din (4), vom căpăta :

$$\frac{dx}{dt} = \frac{K \cdot \text{Ø}(a-x)}{1 + m\,(a - x) + n.x} \tag{6}$$

sau

b) complexul dintre substrat și cantitatea z este o combinație intermediară instabilă, care se desface regenerînd enzima, în care caz viteza va fi proporțională cu z :

$$\frac{dx}{dt} = K_1.z\ (a-x) \tag{7}$$

Introducînd în (7) valoarea lui z din (1), vom căpăta

$$\frac{dx}{dt} = \frac{K_1.m.\text{Ø}\,(a-x)}{1 + m\,(a-x) + nx} \tag{8}$$

ecuație analogă cu (6).

Dacă a este în exces, x poate fi neglijat și ecuațiile (6) sau (8) devin

$$\frac{dx}{dt} = v = \frac{K.\text{Ø}.a}{1 + m.a} \tag{9}$$

Înlocuind pe Ø cu E_0 și pe $a = [S]$, ecuația (9) devine :

$$v = \frac{k \cdot E_0 \cdot [S]}{b + [S]} \tag{10}$$

expresie analogă cu izoterma de adsorbție a lui Langmuir :

$$\Gamma = B.c/(a + c)$$

sau cu funcțiile de tipul :

$$v = k.f\ [S],$$

care reprezintă cinetica acelor reacții în care viteza depinde de un factor limitant (în cazul invertirii zaharozei, de concentrația acesteia). Cînd

$$[S] \to \infty$$

$$v = k \cdot E_0 = V_{max}$$

iar ecuația (10) devine :

$$v = \frac{V_{max.} \cdot [S]}{b + [S]} \tag{11}$$

formă care trebuie reținută, deoarece este întru totul analogă cu ecuația lui Michaelis :

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_s + [S]} \tag{12}$$

Reprezentarea grafică a ecuației (12) duce la hiperbola rectangulară din figura 1. Acesta exprimă legătura dintre viteza unei reacții enzimatice și concentrația substratului. Importanța deosebită a ecuației stabilite de V. Henri constă din aceea că ea se prezintă sub aceeași formă, fie că presupunem existența unui complex enzimă-substrat, fie că nu. Rezultă că reacțiile enzimatice și cele catalitice în general se pot încadra foarte bine în tipul general al reacțiilor chimice obișnuite. Activarea necesară constă, de fapt, în modificarea structurii

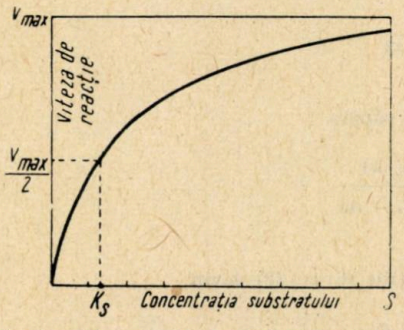


Fig. 1. — Reprezentarea grafică a ecuației de viteză : $v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_s + [S]}$

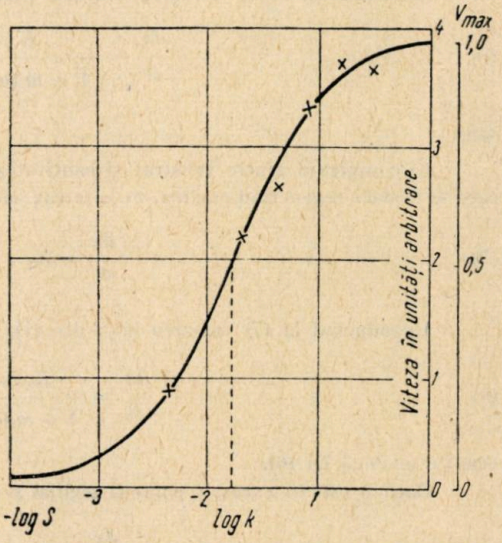


Fig. 2. — Curba pS ($-\log S$) a activității invertazei (după Michaelis și Menten).

stereospecifice a substratului. De altfel, G. Medwedew [16] demonstrează că o cataliză enzimatică poate avea loc și fără formarea unui complex enzimă-substrat, cu condiția ca substratul să preia o anumită cantitate de energie cuantică chiar numai prin ciocniri neelastice. În foarte multe cazuri s-a putut pune în evidență existența complexului enzimă-substrat de către B. Chance [7] și H. Gutfreund [10] , cu ajutorul unor tehnici de mare finețe.

Reluînd ipotezele lui V. Henri, tot în cazul invertazei L. Michaelis și M. L. Menten [17] deduc o relație asemănătoare :

(13) $$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_s + [S]}$$

care, scrisă sub forma

(14) $$v = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_s}{[S]}}$$

a intrat în literatura de specialitate sub denumirea de ecuația lui Michaelis.

Michaelis a stabilit o analogie interesantă între ecuația (13) și aceea care redă variația restului nedisociat al unei baze sau acid în funcție de concentrația în ioni hidrogen a unei soluții

(15) $$\rho = \frac{[H^+]}{[H^+] + K}.$$

Reprezentînd grafic activitatea invertazei în funcție de -log S, se obține o sigmoidă identică cu aceea care redă valoarea lui p din ecuația (15) în funcție de pH (fig. 2).

Curbele pS ale activității enzimatice sînt semnificative pentru activitatea enzimelor și au adus prețioase servicii în enzimologie. În cazul cînd

$$v = V_{max}/2 ,$$

rezultă din (13) că $K_s = S$, K_s notîndu-se acum K_m.

Această valoare particulară a lui K_s este cunoscută sub denumirea de constanta lui Michaelis. De obicei însă, generalizînd, ecuația (13) se scrie

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \tag{16}$$

în care K_m nu mai reprezintă valoarea lui K_s pentru $v = V_{max}/2$, ci o constantă globală a reacțiilor intermediare care au loc în decursul procesului enzimatic. Semnificația acestei constante complexe poate fi mai bine înțeleasă dacă considerăm că o reacție enzimatică decurge în trei etape :

I $\quad E+S \rightleftharpoons E.S$

II $\quad E.S \rightleftharpoons E.S^x \qquad (E.S^x$ complex activ)

III $\quad E.S^x \rightleftharpoons E+P$

în care E = concentrația în enzimă, F = concentrația substratului și P = concentrația produșilor de descompunere. Între formarea complexului $E.S$ și desfacerea lui în produșii P de descompunere se stabilește la un anumit moment un echilibru special, denumit stare staționară (*steady state*), diferit de echilibrul static din cazul reacțiilor chimice în sistemele închise. Succesiunea celor trei etape se reprezintă schematic

$$\text{IV} \qquad E + S \underset{K_{-1}}{\overset{K_{+1}}{\rightleftharpoons}} E.S \underset{K_{-2}}{\overset{K_{+2}}{\rightleftharpoons}} E + P$$

în care K_{+1}, K_{-1}, K_{+2}, K_{-2} reprezintă cele patru constante de viteză, directă și inversă, ale transformărilor din cele trei etape.

Aplicînd legea maselor în cazul reacțiilor directe și inverse al stării de regim staționar, se ajunge la o ecuație de viteză identică cu ecuația (16), în care K_m este dat prin relația :

$$K_m = \frac{K_{-1} + K_{+2}}{K_{+1}} = \frac{K_{-1}}{K_{+1}} + \frac{K_{+2}}{K_{+1}} \tag{17}$$

sau

$$K_m = K_s + \frac{K_{+2}}{K_{+1}} \tag{18}$$

Rezultă că raportul dintre K_{+2} și K_{+1} decide dacă K_m este o adevărată constantă de echilibru termodinamic (static) sau o constantă de echilibru dinamic, într-un sistem deschis care necesită un aport continuu de energie. După cum reiese din ecuația

(18), K_m devine egal cu K_s cînd $K_{+2} \ll K_{+1}$. De obicei $K_m > K_s$.

Inversul lui K_m (adică $1/K_m$) a fost denumit de Michaelis afinitate. Ea nu are însă semnificația afinității chimice în sensul definiției lui van't Hoff, ci este un raport între viteza de formare a complexului enzimă-substrat și desfacerea acestuia în componenți și produși de descompunere. În afară de schema IV, de mai sus, există și alte posibilități de desfacere a complexului $E.S$ în enzimă și produși, precum și stadii intermediare de transformare a acestuia sub acțiunea unor substanțe. Determinarea lui K_m și a lui V_{max} în aceste cazuri comportă scrierea ecuațiilor de viteză în ambele sensuri pentru compușii intermediari și presupunerea că la starea de regim staționar variația concentrației complexului primar $E.S.$ rămîne constantă, adică

$$\frac{d\,[E.S]}{dt} = 0 \tag{19}$$

Rezolvarea acestor ecuații simultane de viteză se face în diferite moduri. Pentru detalii se pot cerceta cu folos lucrările lui E. L. King și C. Altman [14] și J.T.F. Wong și C. S. Hanes [18].

Determinarea constantei globale K_m și al lui V_{max} se face de obicei grafic. Cea mai răspîndită metodă este aceea a lui H. Lineweaver și D. Burck [15].

Scriind ecuația (16) sub forma

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}, \tag{20}$$

se vede (fig.3) că reprezentarea ei în sistemul de coordonate carteziene $1/v$ față de $1/[S]$ este o dreaptă care intersectează axa absciselor în punctul $-1/K_m$ și a ordonatelor în punctul $1/V_{max}$.

Nu stăruim asupra altor metode grafice, dintre care cele mai cunoscute sînt ale lui C. S. Hanes [11] și B.H.J. Hofstee [13], deoarece nu prezintă avantaje asupra celei a lui Lineweaver și Burk. Semnificația biochimică a constantei Michaelis este importantă pentru a ne face o idee justă despre însușirile unei enzime. Din relația (17) rezultă că o valoare mică pentru K_m denotă că viteza de formare a complexului enzimă-substrat este mai mare decît aceea de descompunere. Afinitatea enzimei pentru substrat este deci ridicată, ceea ce denotă o specificitate remarcabilă.

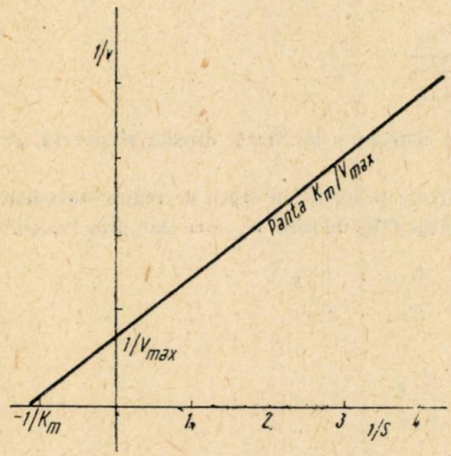


Fig. 3.—Reprezentarea grafică a ecuației Michaelis, scrisă sub forma propusă de Lineweaver și Burk : $\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$

Invers, o valoare mare pentru K_m arată că stabilitatea complexului $E.S.$ este mică, viteza de formare fiind redusă în comparație cu descompunerea lui. S-au propus și metode pentru calcularea separată a diferitelor constante parțiale care intră în componența lui K_m. Determinarea acestora sporește precizia cunoașterii mecanismului de acțiune al enzimelor și al specificității lor.

II. TERMODINAMICA REACȚIILOR ENZIMATICE

Variația vitezei reacțiilor enzimatice cu temperatura constituie un mijloc interesant de a cunoaște structura stereospecifică a enzimelor și modul cum poate fi influențată de către factorii de mediu. Van't Hoff a stabilit că ridicarea temperaturii cu 10° între 0 și 60° mărește viteza reacțiilor chimice de 2—4 ori (regula R.G.T.). Coeficientul termic Q_{10} al unor fenomene fizice ca difuzia, osmoza, viscozitatea etc. este mai mic, între 1,1 și 1,4, iar acela al proceselor de transfer energetic intraatomic este egal cu 1. În cazul reacțiilor enzimatice Q_{10}, variază între 1 și 2, ceea ce constituie un caracter specific al reacțiilor catalitice. O privire mai adîncă relativ la efectul temperaturii asupra activității enzimatice este posibilă cu ajutorul relației empirice propuse de S. Arrhenius încă din secolul trecut :

$$Ln\, k = -\frac{A}{T} + B \tag{21}$$

sau a derivatei sale

$$\frac{dLn\, k}{dT} = \frac{E}{RT^2} - \frac{\mu}{RT^2}, \tag{22}$$

în care k reprezintă constanta de viteză a reacției respective.

Ecuația de mai sus a putut fi dedusă ulterior cu ajutorul datelor experimentale, determinînd echilibrul termic în cazul reacțiilor izobare la diferite temperaturi. Revenind la valoarea lui k din ecuația [22], căpătăm expresia :

$$k = k_0 \cdot e^{-\frac{\mu}{RT}} - k_0 \cdot e^{-\frac{A}{T}}, \tag{23}$$

care poartă denumirea de ecuația Arrhenius-van't Hoff, unde k_0 este un factor care se poate calcula după numărul total al ciocnirilor moleculare, μ fiind energia necesară pentru declanșarea reacției respective. μ poartă denumirea de energie liberă de activare și este un parametru termodinamic important și caracteristic pentru enzime, deoarece reprezintă scăderea barierei de potențial a reacției catalizate de enzima respectivă. Calcularea acestei energii de activare se face ținînd seama că

$$-RTLn\, k = \Delta G = \Delta H - T\Delta S, \tag{24}$$

de unde

$$k = e^{\frac{\Delta S}{R}} \cdot e^{-\frac{\Delta E}{RT}}. \tag{25}$$

Comparînd ecuația (23) cu (25), rezultă că energia de activare se măsoară după căldura reacției catalizate de enzima respectivă. Din (25), prin logaritmare, rezultă

$$\log k = S/2{,}303\ R - \Delta H/2{,}303\ R.1/T, \tag{26}$$

relație care permite să se calculeze grafic valoarea energiei de activare, reprezentînd în sistemul de coordonate carteziene pe $\log k$ în funcție de $1/T$. Se obține o dreaptă a cărei pantă $-\Delta H/2{,}303\ R = \mu/R$ reprezintă energia de activare a enzimei.

Introducînd valoarea calculată în ecuaţia (26), se poate determina şi valoarea lui S (entropia de activare a reacţiei), adică variaţia entropiei sistemului provocată de enzimă. Declanşarea anumitor etape metabolice este legată de o anumită energie de activare, ceea ce demonstrează însemnătatea acestui parametru pentru enzimele implicate. Reprezentarea grafică a log k faţă de $1/T$ conduce de obicei la drepte care prezintă una sau mai multe discontinuităţi. Punctele de frîngere se caracterizează prin anumite temperaturi de tranziţie, deoarece se presupune că se datoresc schimbărilor sterice ale proteinei enzimatice sau ale complexului enzimă-substrat. Se disting două tipuri de discontinuităţi ale dreptelor Arrhenius (fig. 4).

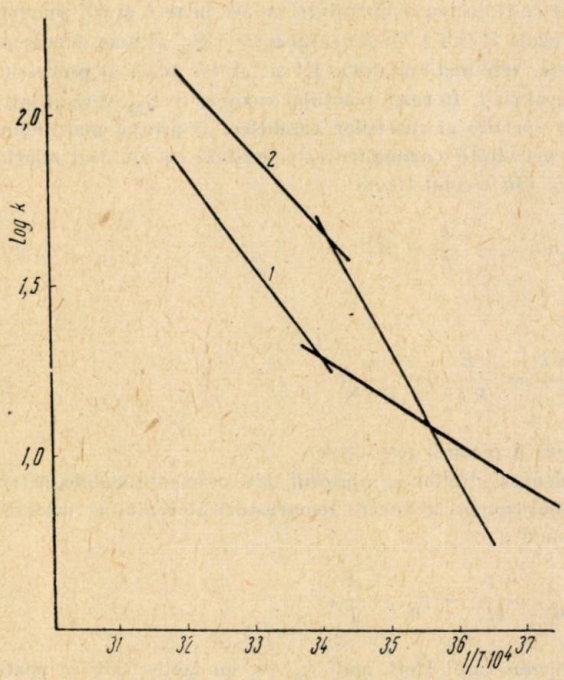


Fig. 4. — Moduri de variaţie a curbelor Arrhenius în cazul ortofosfat-fosfohidrolazei (*E.C.* 3.1.3.2) eritrocitare. Curba 1. Energia de activare scade cu temperatura. Curba 2. Energia de activare creşte cu temperatura.

După cum se vede, unul are concavitatea în sus, cînd energia de activare scade cu temperatura, iar altul concavitatea în jos, cînd energia de activare creşte cu temperatura. În primul caz, enzima suferă o desfacere în subunităţi moleculare cu activitate mai redusă, iar în al doilea coexistă două forme cu aranjamente stereospecifice diferite.

III. IMPORTANŢA CINETICII ŞI TERMODINAMICII ENZIMATICE

Cunoaşterea mecanismului de acţiune a enzimelor este esenţială pentru a înţelege modul de reglare a proceselor metabolice din sînul materiei vii. Sub acţiunea unor substanţe, de obicei metaboliţi ai activităţii celulare, atît conformaţia proteinelor, cît şi proprietăţile lor se modifică. Faptul se reflectă în schimbările suferite de K_m, μ, ΔS, care devin indicatori preţioşi în acest scop. Cercetările cu privire la această problemă se bucură de o deosebită atenţie, fiind un instrument de lucru valoros pentru lămurirea structurii şi mecanismului acţiunii enzimatice.

În special cercetarea inhibiţiei enzimatice a devenit, dintr-o particularitate a cineticii enzimatice, un important instrument de lucru pentru toxicologie, farmacologie, genetică etc. Modul de acţiune de pildă, protecţia şi detectarea a numeroase insecticide, erbicide etc., efectul terapeutic al medicamentelor au fost lămurite cu ajutorul cercetărilor de inhibiţie enzimatică. La fel structura enzimelor, şi în special chimia centrului activ, precum şi a locului de legare cu substratul, mecanismul inducţiei şi represiei, reglarea genetică, sînt tributare acestei metode de lucru. Inhibiţia enzimatică cantitativă este incapabilă să lămurească singură cauza fenome-

nului. Calitatea inhibiției și mecanismul ei intim pot, din contra, să furnizeze informații prețioase. De aceea studiul inhibitorilor fără cercetarea naturii inhibiției este fără importanță practică și științifică.

Există patru tipuri principale de inhibiție, fiecare cu semnificație diferită :

1. *Inhibiția competitivă*, în care inhibitorul se leagă de enzimă în același loc ca și substratul, impiedicînd într-o anumită măsură legarea enzimei cu substratul. În acest caz, ecuația de viteză (20) devine

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{\left(1 + \frac{I}{K_i}\right)}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \tag{27}$$

sau, punînd

$$1 + I/K_i = i$$

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{i}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \tag{28}$$

în care K_i este constanta de disociație a reacției

V $$E + I \rightleftarrows E.I$$

adică

$$K_i = [E].[I]/[E.I]$$

Se vede că în acest caz panta dreptei reprezentate de ecuația (27) crește față de aceea din cazul lipsei inhibitorului, iar $1/V_{max}$ rămîne același.

2) *Inhibiția necompetitivă* , în care inhibitorul nu influențează legarea enzimei de către substrat, dar poate forma un complex cu $E.S$, conform reacției :

VI $$E.S + I \rightleftarrows E.S.I$$

iar

$$K_i = [E.S].[I]/[E.S.I]$$

Constanta Michaelis nu se modifică în acest caz, dar viteza de reacție se micșorează prin reducerea concentrației în complex $E.S$. În acest caz ecuația (20) devine :

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{i}{[S]} + \frac{i}{V_{max}} \tag{29}$$

Se vede că atît panta dreptei , cît și $1/V_{max}$ cresc. Viteza reacției s-a micșorat.

3) *Inhibiția cuplantă* sau mixtă este un caz special al celei necompetitive, în care inhibitorul se leagă nu numai de locul specific, ci de întreaga suprafață a enzimei. Ecuația lui Michaelis ia forma

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{i}{V_{max}} \tag{30}$$

Deoarece panta rămîne aceeași ca în lipsa inhibitorului, valoarea lui K_m va scădea, căci $1/V_{max}$ crește la i/V_{max}. De obicei acest fel de inhibiție se întîlnește cînd inhibitorul reduce

viteza de desfacere a complexului activ $E.S$, adică atunci cînd are loc o micşorare a constantei de viteză K_{+2}. Inhibiţia necompetitivă şi cuplantă sînt asociate, ultima constituind limita primei, pe măsură ce concentraţia substratului creşte.

4) *Inhibiţia de saturaţie* se datoreşte combinării substratului cu complexul enzimă-substrat, conform reacţiei :

VII $$E \cdot S + n \cdot S \rightleftharpoons E \cdot S_{n+1}$$

în care caz, ecuaţia de viteză devine

(31) $$\frac{1}{v} = \frac{1}{1 + \frac{K_m}{[S]} + \frac{[S]^n}{K_i}}$$

Reprezentarea grafică a lui $1/v$ în funcţie de $1/[S]$ nu mai dă o dreaptă, deoarece intervin şi termeni S la puteri mai înalte. Numai pentru concentraţii mici se păstrează liniaritatea ecuaţiei (31). Se cunosc numeroase cercetări cu privire la natura inhibiţiei şi la semnificaţia ei, aşa încît nu este cazul unor exemplificări.

Inhibitorii produc implicit şi modificarea energiei de activare, fapt care se poate pune în evidenţă prin schimbările suferite de dreptele Arrhenius respective. Cercetările în acest domeniu sînt mai puţin dezvoltate decît în cazul cineticii enzimatice. Semnificaţia rezultatelor nu este însă mai puţin interesantă, deoarece se referă la structura macromoleculară a proteinei enzimatice. Cercetînd efectul inhibitorilor asupra energiei de activare, se constată că se produce o scădere a acesteia. În figura 5 din lucrarea lui L. M. Buruiană şi El. Hadarag [4] este redată influenţa heparinei asupra energiei de activare a ortofosfat-fosfohidrolazei (*E.C.* 3.1.3.2.) eritrocitare.

Se ştie că heparina este un puternic inhibitor al acestei enzime (L. M. Buruiană [3]). Scăderea se datoreşte modificării structurii proteinei enzimatice, care devine astfel mai sensibilă la efectul termic, fapt verificat prin modul cum variază entropia de activare.

Acţiunea inhibitorului asupra enzimelor se poate manifesta şi în alt fel. L. M. Buruiană şi El. Hadarag [5,6] constată în cazul pirofosfat-fosfohidrolazei (*E.C.* 3.6.1.1) eritrocitare că inhibiţia produsă de substrat variază cu concentraţia acestuia (fig. 6).

Se vede că temperatura de tranziţie creşte cu concentraţia substratului, ceea ce arată că se produce o „fixare" a structurii proteice de către inhibitor.

În cazul ortofosfat-fosfohidrolazei eritrocitare, deşi substratul nu este inhibitor, el exercită totuşi un efect stabilizator asupra proteinei enzimatice, aceasta devenind mai rezistentă la denaturarea termică (fig. 7).

Determinarea energiei de activare poate folosi şi la ridicarea nespecificităţii unor enzime. Astfel, între ortofosfat-fosfohidrolazele homotrope homoionice din eritrocite şi din spermă energia de activare variază diferit sub influenţa substratului (fig. 8).

În acest caz, prin creşterea concentraţiei substratului punctul de tranziţie dispare mult mai repede în cazul spermei decît în al eritrocitelor. Rezultă că proteina enzimatică are o structură diferită în cazul celor două fosfataze identice din punctul de vedere al comportării cinetice.

Această direcţie de cercetare este deosebit de promiţătoare, mai ales în studiile de biochimie comparată şi de biochimie genetică. Ea este dezvoltată în laboratorul nostru, o parte din rezultatele obţinute fiind deja publicate.

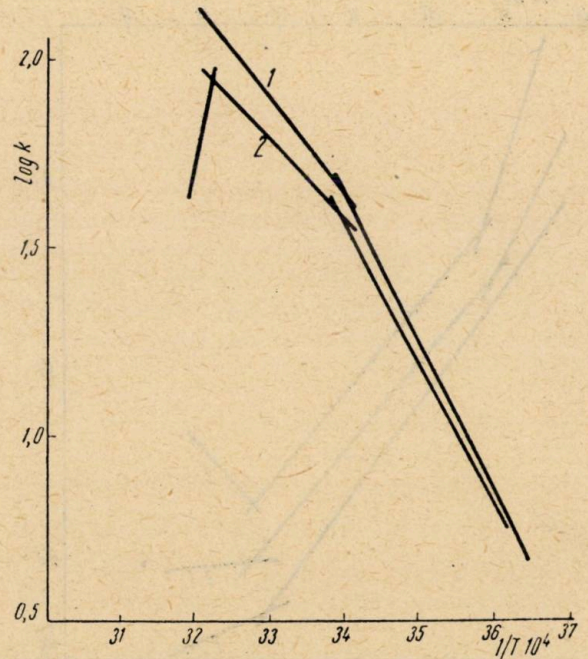


Fig. 5. — Influența heparinei asupra energiei de activare a ortofosfat-fosfohidrolazei (E.C. 3.1.3.2) eritrocitare. Curba 1. Fără heparină. Curba 2. Cu heparină 10 mg%. Se observă că sub influența heparinei se produce o inactivare rapidă a enzimei.

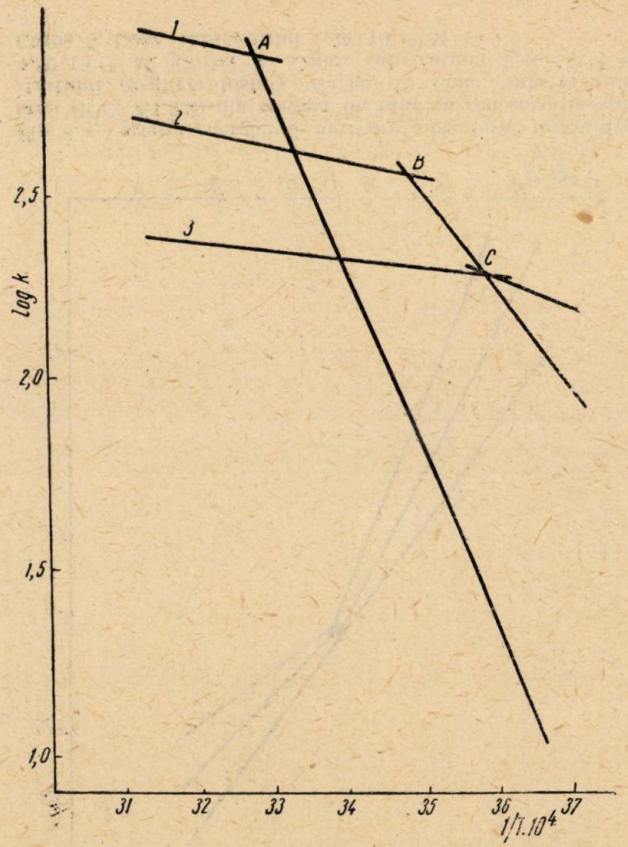


Fig. 6.—Variația energiei de activarea pirofosfat-fosfohidrolazei (*E.C.* 3.6.1.1.) eritrocitare cu concentrația substratului. Curba 1. Conc. substratului $1{,}6 \cdot 10^{-3}$ M. Curba 2. Conc. substratului $0{,}8 \cdot 10^{3}$ M. Curba 3. Conc. substratului $0{,}4 \cdot 10^{-3}$ M. Se observă deplasarea punctului de tranziție A→B→C.

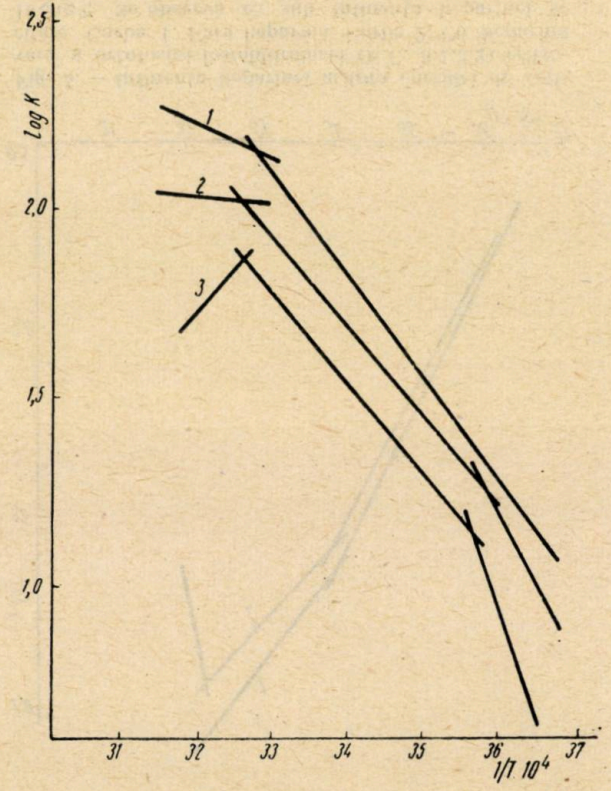


Fig. 7.—Variația energiei de activare a ortofosfat-fosfohidrolazei (*E C.* 3.1.3.2.) eritrocitare cu concentrația substratului (α-glicerofosfat). Curba 1. Conc. substratului $4{,}80 \cdot 10^{-3}$ M. Curba 2. Conc. substratului $2{,}40 \cdot 10^{-3}$ M. Curba 3. Conc. substratului $1{,}20 \cdot 10^{-3}$ M.

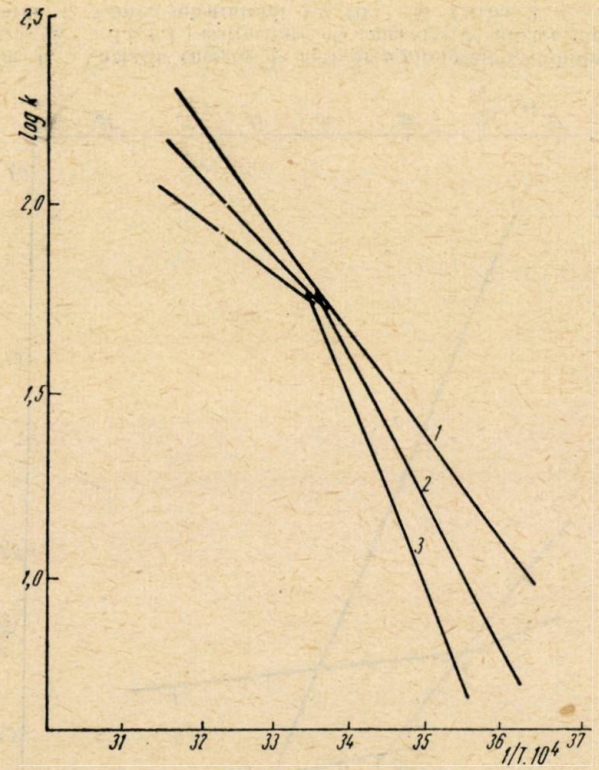


Fig. 8.—Variația energiei de activare a ortofosfat-fosfohidrolazei (E.C. 3.1.3.2) din sperma de taur cu concentrația substratului (α-glicerofosfat). Curba 1. Conc. substratului: $4{,}80 \cdot 10^{-3}$ M. Curba 2. Conc. substratului $2{,}40 \cdot 10^{-3}$ M. Curba 3. Conc. substratului $1{,}20 \cdot 10^{-3}$ M.

CONCLUZII

1) Mecanismul fizico-chimic al reacțiilor enzimatice se încadrează în acela al reacțiilor chimice obișnuite.

2) Cinetica acestor reacții se poate determina aplicîndu-se legea maselor. Prima tentativă în acest scop a fost făcută de către V. Henri [12], ținînd seama de unele particularități observate în cursul reacțiilor catalizate de hidrolaze.

3) Ecuația lui V. Henri a fost regăsită ulterior de către L. Michaelis și M. L. Menten (1913), viteza fiind exprimată printr-o formulă identică

$$v = V_{max} \cdot [S]/K_m + [S'],$$

cunoscută azi universal sub denumirea de ecuația lui Michaelis.

4) O importanță deosebită pentru caracterizarea enzimelor o prezintă constanta K_m, care este o constantă complexă, a cărei semnificație se discută în lucrare.

5) Termodinamica reacțiilor enzimatice se referă la modul cum variază viteza de reacție cu temperatura. În acest caz legea generală Arrhenius-van't-Hoff se aplică și pentru enzime.

6) O valoare deosebită pentru cercetările enzimatice o prezintă determinarea valorii lui μ, energia de activare, care dă informații asupra calității enzimelor. Se arată modul de calculare a lui μ.

7) Cinetica și termodinamica enzimelor prezintă o deosebită importanță pentru studiul metabolismului, precum și pentru cercetarea acțiunii farmacologice și toxicologice a numeroase substanțe.

8) Deosebit de interesant și de util în acest scop este modul cum variază energia de activare enzimatică sub acțiunea unor anumiți compuși și chiar a substratului.

Prezentată la redacție
la 3 octombrie 1965

Laboratorul de biochimie,
Facultatea de medicină veterinară, București

BIBLIOGRAFIE

1. J. J. Berzelius, Ann. chim. phys., **LXI**, 146 (1836).
2. A. J. Brown, J. chem. Soc., **57**, 834 (1890).
3. L. M. Buruiană, Naturwiss., **44**, *10*, 306 (1957).
4. L. M. Buruiană și El. Hadarag, St. cerc. biochim., **III**, *2*, 141 (1960).
5. L. M. Buruiană și El. Hadarag, Com. I. Sez. științifică Republicană de chimie, 28—31 V, Iași (1964).
6. L. M. Buruiană și El. Hadarag, Com. II, Sez. științifică Republicană de chimie, 28—3 V, Iași (1964).
7. B. Chance. J. biol. Chem., **151**, 553 (1943).
8. M. Dixon and E. C. Webb, *Enzymes*, ed. a 2-a, Longmans, Londra, p. 5, 1964.
9. E. Duclaux, *Traité de Microbiologie*, vol. II, 1899.
10. H. Gutfreund, Disc. Faraday Soc., **20**, 167 (1955).
11. C. S. Hanes, Biochem. J., **128**, 425 (1940).
12. V. Henri., C. R. Acad. Sci., Paris, **135**, 916 (1902).
13. B. H. J. Hofstee, Nature, **184**, 1296 (1959).
14. E. L. King, C. Altman, J. phys. Chem., **60**, 1375 (1956).
15. H. Lineweaver, D. Burk, J. amer. Chem. Soc., **56**, 658 (1934).
16. G. Medwedew, *Enzymologia*, vol. 2, 1, 31 și 53 (1937).
17. L. Michaelis, M. L. Menten, Biochem. Z., **49**, 333 (1913).
18. J. T. F. Wong, C. S. Hanes, Canad. J. Biochem. & Physiol., **40**, 763 (1962).

ST. CERC. BIOCHIM., 9, 1, 81–90 (1966)

AGENȚII ALCHILANȚI ȘI INFLUENȚA LOR ASUPRA ACTIVITĂȚII ENZIMELOR

M. FURNICĂ

612.398:612

Agenții alchilanți fac parte din categoria substanțelor citostatice utilizate în chimioterapia cancerului. Rezultatele încurajatoare obținute cu acești agenți au dus la dezvoltarea celui mai nou domeniu al oncologiei, chimioterapia tumorilor maligne [1], [2]. Alături de antimetaboliți, de diferite preparate vegetale, de unii hormoni și antibiotice, agenții alchilanți ocupă un loc foarte important în tratamentul cancerului.

Grupa agenților alchilanți include o mare diversitate de structuri chimice, care pot fi clasificate în următoarele cinci tipuri: iperite (cloretilamine), etilenimine, esteri ai acidului metansulfonic, epoxizi și diazoderivați alifatici. Toate aceste substanțe au o caracteristică comună: capacitatea de a reacționa cu anumite grupări „nucleofile", producînd o reacție de „alchilare"

MECANISMUL DE ACȚIUNE AL AGENȚILOR ALCHILANȚI CU PROTEINELE [3]

Mecanismul chimic care stă la baza acțiunii biologice a acestor citostatice este fenomenul de „alchilare", adică de înlocuire a unui atom de hidrogen dintr-o moleculă printr-o grupare alchil. Gruparea alchil poate avea o structură simplă, cum este radicalul etil, sau compuși derivați: $-CH_2-CH_3$; $-CH_2-CH_2-OH$; $-CH_2-CH_2-NH_2$; $-CH_2-CO-CH_3$; $-CH_2-CH_2-COOH$. Compusul care provoacă înlocuirea atomului de hidrogen se numește agent alchilant.

În general, are loc următoarea reacție

$$R:A + B^- \rightarrow R:B + A^-$$

în care B este substanța care reacționează cu agentul alchilant RA. În această reacție, gruparea A legată de radicalul alchilic R poate fi detașată mai ușor sau mai greu, împreună cu electronii implicați în legătura chimică; gruparea R va rămîne încărcată cu sarcini electrice pozitive, care necesită electroni. De aceea agenții alchilanți apar ca agenți electrofili, care se combină cu grupări bogate în electroni, adică grupări nucleofile.

Mecanismul reacției de alchilare poate urma două căi:

1. Prin separarea completă a radicalului R^+ de A^- în prezența moleculelor solvenților polari. Se formează un ion carboniu care reacționează rapid cu un centru bogat în electroni din sistem:

$$RA \rightarrow R^+ - \text{solvent} + A^- - \text{solvent (reacție lentă)};$$

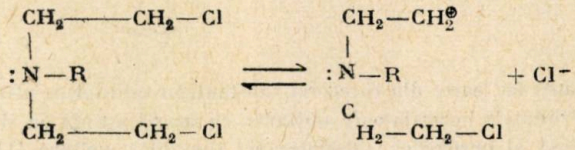
$$R^+ - \text{solvent} + B^- - \text{solvent} \rightarrow RB + \text{solvent (reacție rapidă)}.$$

2. Printr-o fază de tranziție, în care radicalul R se combină temporar cu ambele grupări chimice :

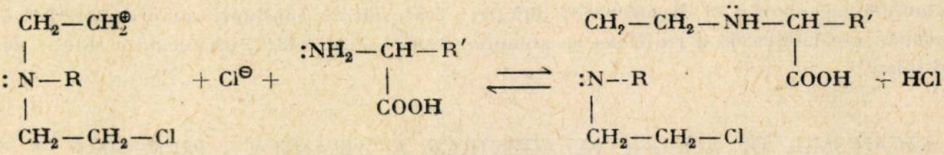
$$RA + B^{-} \rightarrow [B \ldots R \ldots A] \rightarrow RB + A^{-}.$$

Complexul polar format suferă și el fenomenul de solvatare, după care are loc transferul de sarcină și formare de legături noi.

Reacțiile chimice ale agenților alchilanți sînt, în general, asemănătoare între ele. Luînd ca exemplu *cloretilaminele*, se constată că în soluție apoasă se produce ionizarea moleculelor și formarea ionului de carboniu, după mecanismul descris mai sus :

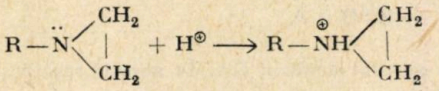


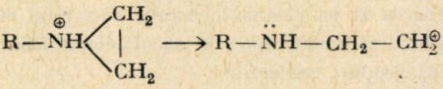
În prezența unor diferiți compuși, ionul carboniu, care conține o sarcină pozitivă, reacționează cu centrii nucleofili care au cel puțin un dublet electronic liber. În cazul unui aminoacid, are loc următoarea reacție :

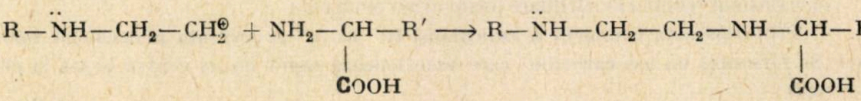


A doua grupare cloretil reacționează cu o nouă moleculă de aminoacid. Reacții chimice analoge se produc cu grupările —SH, —OH, —COOH și cu grupările imidazolice din molecula proteinelor. În condiții fiziologice de temperatură și pH, aceste reacții reprezintă o caracteristică a cloretilaminelor.

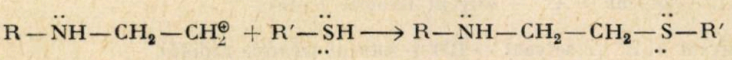
În cazul *etileniminelor*, reacțiile care se petrec cu proteinele au loc prin desfacerea inelului etileniminic :



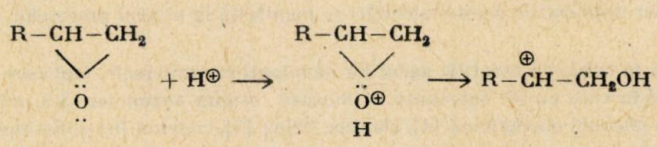


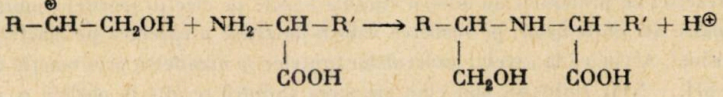


sau

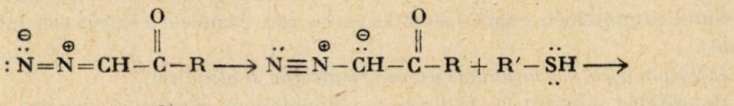


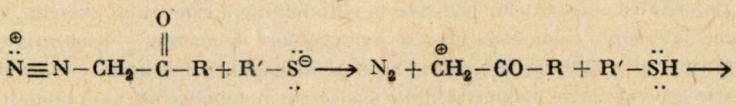
Și în cazul *epoxizilor* are loc o rupere a inelului, după care substanța poate reacționa cu centrul nucleofil :

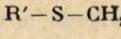




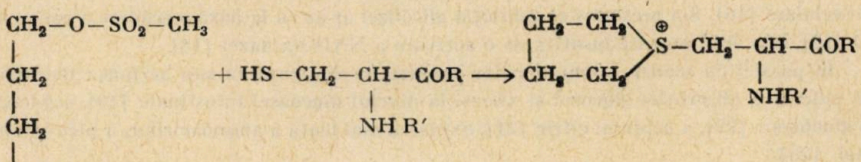
Diazoderivații alifatici acționează astfel :

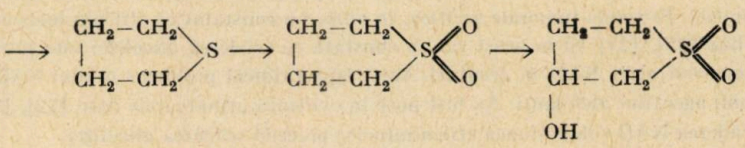






Spre deosebire de ceilalți agenți alchilanți, care dau reacții de tip monomolecular, *esterii alchilici ai acidului metan*-sulfonic reacționează printr-un mecanism bimolecular, care implică ruperea legăturii alchil-oxigen și formarea intermediară a unui ion sulfonium :





Acești compuși reprezentați mai sus au fost puși în evidență în cazul reacției mileranului cu cisteina din molecula proteinelor (R = OH, aminoacid, peptid, rest proteic ; R′ = H, aminoacid, peptid, rest proteic).

Sînt foarte importante reacțiile chimice ale agenților alchilanți cu acizii nucleici, dar peste ele vom trece, neconstituind obiectul referatului de față.

În reacția de alchilare, viteza de înlocuire a lui A^- prin B^- depinde de capacitatea nucleofilă relativă a celor două grupări A^- și B^- și de natura radicalului alchilic R. Intensitatea cu care este atacat compusul nucleofil B^- este condiționată de capacitatea lui de a dona electroni și de ușurința cu care poate fi scindată legă-

tura R-A. Este bine stabilit că reacția principală și de importanță maximă pentru activitatea biologică a celulei este aceea a citostaticelor cu acizii nucleici. Aceasta se desfășoară cu rapiditate maximă, iar implicațiile acestei alchilări se manifestă la nivelul proceselor sintetice, al mitozei etc.

S-au pus în evidență reacțiile agenților alchilanți cu proteinele, fapt care a ajutat la stabilirea modului în care aceste substanțe acționează asupra enzimelor. S-a arătat că iperitele reacționează cu glicolul, glicilglicina [4], alanina, lizina [5], cisteina [6] și metionina [7]. Dovada biologică a reacției cu proteinele au adus-o studiile bazate pe efectul iperitei asupra proprietăților imunologice ale proteinelor, pe scăderea valorii nutritive a cazeinei, pe inactivitatea insulinei și a pepsinei. Acțiunea la nivelul moleculelor proteice se manifestă prin reacția cu grupările $-COOH$, $-SH$, $-NH_2$, imidazol, dar cînd gruparea aminică se află în poziția α, reacția este mai slabă. În experiențe cu iperită $-S^{35}$ pe drojdie s-a constatat că 50% din S^{35} se leagă de glutation, 10% de enzimele celulare, iar 40% se repartizează la elementele structurale [8]. Reacțiile chimice cu proteinele explică modificarea pe care enzimele o suferă sub influența agenților alchilanți.

Influența agenților alchilanți asupra respirației și glicolizei.

Majoritatea substanțelor utilizate în chimioterapia cancerului exercită un efect puternic și imediat asupra celor două procese producătoare de energie — respirația și glicoliza. Deși diversele tipuri de celule canceroase sînt afectate în mod inegal de agenții citostatici, există totuși o corelație generală între răspunsul clinic și efectele metabolice ale unui anumit agent. Din studiile timpurii ale lui Warburg este cunoscut faptul că în celula canceroasă au loc tulburări metabolice care fac ca glicoliza să fie principalul proces producător de energie în țesutul tumoral. De aceea s-a și propus ca test pentru selectarea compușilor antitumorali capacitatea lor de a inhiba glicoliza [9].

S-a observat că iperitele inhibă respirația și glicoliza [10—15] și că ar exista o corelație relativă între gradul de inhibiție a acestor procese și acțiunea carcinostatică sau inhibiția diviziunii celulare [16]. S-a presupus că inhibiția glicolizei ar avea la bază o scădere a concentrației NAD [17], care însă nu este însoțită de o activare a NAD-oxidazei [18].

În paralel cu scăderea schimburilor gazoase, se constată că sub acțiunea iperitelor are loc și reducerea absorbției glucozei și xilozei la nivelul mucoasei intestinale [19], scăderea sintezei glucidelor [22], a acidului citric [21], oxidarea mai lentă a aminoacizilor, a piruvatului și a colinei [20].

Compușii etileniminici acționează în special asupra glicolizei și exercită un efect mai redus asupra respirației. Pe celule tumorale ascitice, *in vitro*, s-a constatat că etileniminobenzochinona inhibă glicoliza [22], [24]. Și în acest caz se constată că scăderea glicolizei este însoțită de o reducere a concentrației NAD în țesuturi. Acest fapt a ridicat problema rolului NAD în mecanismul acțiunii agenților alchilanți. Au fost puse în evidență următoarele date [22], [25], [26]:

1. Scăderea NAD sub acțiunea etileniminelor precedă scăderea glicolizei.

2. Administrarea de nicotinamidă previne scăderea NAD și a glicolizei, indusă de citostatice.

3. Acțiunea protectoare a glicolizei prin nicotinamidă nu are loc printr-un proces de detoxificare de agentul alchilant, căci substanța se alchilează destul de greu.

4. Scăderea concentrației NAD se datorește unei sinteze scăzute a substanței și nu unei scindări rapide.

5. Activitatea NAD-azei, NAD-pirofosforilazei, NAD-pirofosfatazei, $NADH_2$-pirofosfatazei nu este modificată de etilenimine.

Derivații estersulfonici de tipul mileranului produc o scădere a respirației celulelor tumorale ascitice, în special prin efecte fizice asupra transporturilor de hidrogen din celulă; spălînd

celulele pentru a îndepărta agentul alchilant, respirația revine la normal [27]. S-a constatat de asemenea că mileranul, care este folosit în leucemia mieloidă cronică, inhibă glicoliza celulelor leucemice din sîngele circulant.

Epoxizii (butadiendioxidul) nu au efect asupra respirației celulare, dar inhibă *in vitro* încorporarea glicinei-1-C-^{14} în proteinele celulelor carcinomatoase Ehrlich [28]. Mecanismul de acțiune al acestor agenți se pare că se reduce exclusiv la alchilarea ADN. Afirmații asemănătoare sînt valabile și în cazul diazoderivaților alifatici. Studiile biochimice efectuate cu acești compuși sînt mult mai reduse și de dată recentă, dar din datele existente reiese că nici aceștia nu influențează respirația, glicoliza sau sistemele enzimatice corelate [29].

Ca o concluzie în ce privește acțiunea agenților alchilanți asupra proceselor producătoare de energie din celulă, reiese că nu toate substanțele citostatice inhibă respirația și glicoliza, că afectarea acestor procese nu constituie reacția primară care să stea la baza acțiunii antitumorale, dar că inhibitorii cei mai puternici ai creșterii tumorale au și o acțiune asupra respirației și glicolizei [30].

ACȚIUNEA AGENȚILOR ALCHILANȚI ASUPRA ACTIVITĂȚII ENZIMELOR

Agenții alchilanți utilizați în chimioterapia cancerului exercită prin acțiunea lor toxică un efect uneori destul de pronunțat asupra activității enzimelor. Acest efect se manifestă cu aceeași intensitate asupra enzimelor, indiferent dacă ne referim la țesuturi normale sau tumorale. Pentru elucidarea acestor observații au fost întreprinse o serie de studii cu atomi marcați, în vederea precizării repartiției agenților alchilanți în țesuturi.

După administrare de iperită-S^{35} s-au constatat următoarele [31—33] :

1. Rapiditate extremă de metabolizare. După 2 min de la administrare, concentrația substanței din plasmă se reduce cu 90%.

2. Nu se observă o localizare specifică în țesuturi. Concentrații mai crescute de agent alchilant se găsesc în organele de excreție : rinichi, plămîn, ficat.

3. Nu se observă o captare selectivă în tumori, deci influența lor mai accentuată asupra tumorilor trebuie explicată altfel decît prin repartiția preferențială.

4. Nu se constată o relație între concentrația substanței într-un anumit țesut și leziunea produsă. În măduvă, radioactivitatea este slabă, dar fenomenul de toxicitate este intens, în timp ce plămînul, care nu este puternic afectat de medicament, acumulează mult sulf radioactiv. Unii autori consideră că ar fi posibil ca substanța activă să fie mascată de alt metabolit.

5. Substanțele administrate nu se elimină prin urină înainte de a fi metabolizate. Calea comună de metabolizare a acestor substanțe ar fi detașarea moleculei alchilante de porțiunea de transportor a moleculei.

Deși reacțiile chimice care se produc între agenții alchilanți și agentul nucleofil par să fie aceleași în țesuturile normale și în cele canceroase, desigur că unele reacții au un efect mai mare asupra celulelor tumorale. Numeroase studii biochimice efectuate *in vitro* și *in vivo* au ridicat problema necesității de a cunoaște reacția primară răspunzătoare de efectele biologice și fiziologice observate. Se admite astăzi că acțiunea citotoxică a agenților alchilanți este rezultatul direct sau indirect al alchilării nucleoproteinelor. Ca urmare, apar tulburări în procesul de mitoză, și în special în replicarea ADN. Acest ADN modificat induce formarea unui ARN degenerat, care la rîndul său va influența gradul de sinteză proteică, deci și sinteza enzimatică. Toate studiile mai noi au arătat că ADN este materialul biologic cel mai sensibil la alchilare, că la acest nivel ar avea loc reacția biochimică primară și că poziția 7 din molecula guaninei este deosebit

de sensibilă la alchilare [34]. Compusul rezultat din alchilarea guaninei din ADN acționează la rîndul său ca un antimetabolit purinic.

Deși există deosebiri importante între proprietățile chimice ale diferiților agenți alchilanți, acțiunea lor biochimică este destul de asemănătoare. Asupra enzimelor influența lor se manifestă fie prin inhibiția acțiunii acestora, fie printr-o creștere a activității.

I. *Enzime inhibate.* S-a constatat că unele enzime implicate în procesul de respirație și glicoliză suferă o inhibiție sub acțiunea dicloretilaminelor.

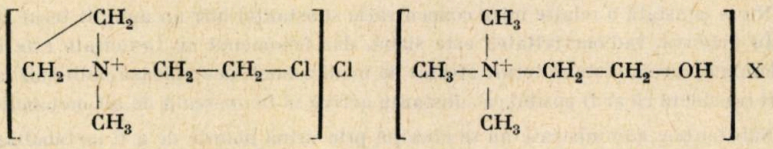
Așa este cazul *succindehidrogenazei* și al *citocromoxidazei* din ficatul și hepatomul de șoarece [35], [36].

Deosebit de sensibilă la acțiunea iperitei este *hexochinaza*, a cărei inhibiție ar putea explica influența asupra glicolizei [37]. Foarte sensibile la acțiunea iperitelor sînt și *fosfatazele* : fosfataza acidă din ficatul de șobolan, fosfataza alcalină din rinichiul și intestinul subțire, piruvat-fosfochinaza și pirofosfataza. Deși foarte sensibile la acțiunea acestor substanțe, nu s-a putut pune în evidență o corelație strictă între susceptibilitatea sistemelor enzimatice *in vivo* și *in vitro* ; în general, dozele necesare pentru a inactiva aceste enzime *in vitro* sînt mult mai mari decît cele utilizate în chimioterapie [38].

În ceea ce privește etileniminele, se constată că ele inhibă *fosfofructochinaza, triozfosfatdehidrogenaza, gliceraldehid-fosfatdehidrogenaza, peroxidaza* [39], dar că exercită o slabă influență asupra hexochinazei și NAD-oxidazei. Tio-TEPA produce o scădere a activității fosfatazei acide și alcaline din sarcomul 45 de șobolan [40]. Mecanismul de reacție care stă la baza acțiunii etileniminelor asupra enzimelor poate consta dintr-o alchilare a enzimelor, dar gradul de alchilare variază cu natura enzimei.

Etileniminele sînt deosebit de reactive cu grupările SH proteice, cu care formează un complex ; acesta se descompune eliberînd un nou compus, care nu mai conține gruparea SH liberă ; descompunerea acestui complex este condiționată de prezența în moleculă a unei grupări aminice în poziția β față de gruparea SH [41]. Dar alături de procesul de alchilare etileniminele produc și o inhibiție a sintezei enzimelor, ele inhibînd *in vivo* încorporarea glicinei și lizinei în proteinele limfosarcomului [42].

O enzimă foarte sensibilă la acțiunea etileniminelor este *colinoxidaza*. Această sensibilitate ar avea la bază asemănarea structurală a ionului etilenimoniu cu colina [3] :



ionul etilenimoniu *colina*

Din cauza analogiei structurale, ionul etilenimoniu se asociază la suprafața enzimei la același receptor ca și colina, împiedicînd contactul dintre enzimă și substrat.

Colinesterazele sînt și ele influențate de agenții alchilanți. Trebuie totuși menționat de la început că activitatea citotoxică și cea anticolinesterazică nu merg paralel, așa cum s-a crezut [43]. În timp ce substanțe ca HN_2 și β-etilenimina inhibă acetilcolinesteraza din țesutul nervos, dar mai ales pseudocolinesteraza serică, epoxizii și derivații metansulfonici nu au activitate anticolinesterazică. Studiul anticolinesterazic al trietilenmelaminei (TEM) a dus la unele rezultate interesante. S-a pus în evidență că *in vitro* TEM este mai activ asupra acetil-colinesterazei la pH = 6,3 decît la pH = 7,4, la care se efectuează de obicei determinările. S-a constatat că acțiunea etileniminelor asupra colinesterazelor este progresivă și ireversibilă. Importanța pH la care

acționează agentul alchilant apare și în cazul propilenoxidului, care la pH = 8,3 inhibă colinesteraza eritrocitară în proporție de 14%, iar la pH = 6,3 în proporție de 50%.

Tot printre enzimele sensibile la acțiunea citostaticelor trebuie citate *pepsina, pepsinaza, peptidaza* din ser, plămîn și rinichi [34]. Studii efectuate în Institutul de oncologie cu Tio TEPA și OCO 54 (produs nou, pe bază de iperită, sintetizat în Institutul de oncologie) au pus în evidență o inhibiție timpurie a activității *tripsinei* în ficatul și splina șobolanilor purtători de tumori Jensen sau Walker.

De asemenea se constată că activitatea *transpeptidazică* este corelată de sensibilitatea tumorii la citostaticul respectiv [44].

Esterii acidului metansulfonic acționează mult mai slab decît alte citostatice asupra încorporării aminoacizilor în proteine. Ei acționează în special cu grupările SH din albumine, cu grupările carboxil și imidazol, dar nu cu grupările aminice din albumina serică [4], [5].

II. *Enzime activate* sub influența citostaticelor : azotiperitele măresc activitatea *adenozintrifosfatazei* și *5'-nucleotidazei* din splina și timusul șoarecilor și al șobolanilor [45]. Acțiunea aceasta se manifestă în egală măsură asupra ATP-azei activate de ionii de calciu, ca și asupra ATP-azei activate de ionii de magneziu [46]. Sarcolizina mărește activitatea ATP-azei din măduva și mielomul de șobolan [47]. De asemenea se constată creșterea activității *transaminazei* alanino-α-cetoglutarice și aspartico-α-cetoglutarice din ficatul și splina șobolanilor [48].

Foarte mici concentrații de azot-iperită măresc activitatea *ribonucleazei* din omogenate de tumori ascitice, probabil datorită inactivării unui inhibitor natural [49].

Activitatea *dezoxiribonucleazei* este foarte slab modificată de agenții alchilanți *in vivo*, iar după 2 ore de la administrarea citostaticului ea revine la normal. În nici un caz nu există o proporționalitate între alterările pe care le suferă ADN și influența asupra activității dezoxiribonucleazei [50].

Enzime serice : S-a constatat că administrarea la om, în doză mare unică, a diferiților agenți alchilanți ca Tio-TEPA, sarcolizină, TEM, endoxan, mitomen, sinalost, E 39, trenimon, la pacienți cu cancer mamar, produce o creștere a activității *aldolazei* și *transaminazei* glutamico-oxalacetice și glutamico-piruvice. Maximul activității acestor enzime se constată după 2—5 luni de la administrarea dozelor mari de citostatic sub protecție de autogrefă medulară. Autorii interpretează rezultatele prin intervenția simultană a mai multor factori : necroza tumorală, efect toxic asupra ficatului, efectul produșilor de liză tumorală [51].

În cazul *lacticdehidrogenazei* și *malicdehidrogenazei*, foarte crescute în cazuri de carcinoame avansate, se constată o revenire la normal în urma tratamentului [52]. Revenirile la normal se observă numai la pacienții la care agentul chimioterapic a exercitat o acțiune favorabilă asupra tumorii. La pacienții la care tumoarea a fost rezistentă la tratament, activitatea enzimatică continuă să fie ridicată [53].

CONCLUZII

Acțiunea agenților alchilanți asupra enzimelor duce la o inhibare sau la o accentuare a activității lor. Această influență, deși uneori dovedește o sensibilitate deosebită — cum este cazul hexochinazelor sau al colinoxidazelor — nu reprezintă totuși un mecanism primar de acțiune [54]. Mai curînd s-ar putea considera ca factor important în influențarea activității enzimelor atacul la suprafața membranei celulare, cu modificarea permeabilității. În general, influențarea majorității enzimelor *in vitro* necesită concentrații de agent alchilant cu mult mai mari decît cele corespunzătoare dozelor terapeutice.

Modificările activității enzimelor se pot explica prin:

1. Inhibiția sintezei enzimei (inclusă în procesul general de inhibiție a sintezei proteice). S-a constatat că încorporarea C^{14} aminoacizilor în proteinele celulelor tumorale este inhibată de iperite și că însăși compoziția în aminoacizi a acestor proteine este modificată [55]. În general, se constată o scădere a conținutului în cisteină și metionină și o creștere a înglobării prolinei. Concentrații de iperită mai mari decît cele necesare pentru inhibarea completă a mitozei influențează slab sinteza *in vitro* a proteazei și amilazei [56].

2. Inactivarea enzimei, a unei coenzime sau a unui inhibitor enzimatic. Această inactivare se realizează prin alchilarea moleculelor enzimatice la nivelul grupărilor -SH, COOH, $-NH_2$, imidazol etc.

Administrarea unor substanțe chimice de tipul cisteamină, cistamină, AET exercită un efect protector asupra enzimelor [57]. Aceste substanțe, prin grupările SH pe care le conțin, se alchilează foarte repede, înaintea substratului biologic, exercitînd astfel un efect protector în țesuturi.

Prezentată la redacție la 1 noiembrie 1965

Institutul de oncologie, București

BIBLIOGRAFIE

1. L. F. Larionov, *Chimioterapia tumorilor maligne*, Edit. medicală, București, 1963.
2. O. Costăchel, U. Bunescu, *Oncologia generală*, Edit. medicală, București, 1961.
3. W. C. Y., Ross, *Biological alkylating agents*, Edit. Butterworths, Londra, 1962, p. 3.
4. D. E. Douglas, R. D. H. Heard, *Observations on reaction of sulfurmustard with glycine*, Canad. J. Chem., **32**, 221 (1954).
5. S. Moore, W. H. Stein, J. S. Fruton, *The reaction of mustard gas with carboxyl groups and with the amino group of amino acids and peptides*, J. Org. Chem., 11, 675 (1946).
6. J. C. Boursnell, G. E. Francis, A. Wormall, *The action of mustard gas, ββ'-dichlorodiethyl sulphone and divinyl sulphone on amino-acids*, Biochem. J., **40**, 737, (1946).
7. W. H. Stein, S. Moore, *The reaction of mustard gas with methionine*. J. Org. Chem., **11**, 681 (1946).
8. V. E. Kinsey, W. M. Grant, *Action of mustard gas and other poisons on yeast cells*, Chem. Abstr., **41**, 5 170 (1947).
9. E. Gladys, Woodward, Marie T. Hudson, *Inhibition of yeast fermentation as a technic for selecting compounds likely to inhibit tumor glycolysis*, Cancer Research, **18**, *403*, II (1958).
10. Z. Miller, *Effect of methyl-bis (beta-chlorethyl) amine on aerobic glycolysis of thymus lymphocytes*, Proc. Soc. exp. Biol. Med., **87**, 170 (1954).
11. A. A. Tustanovski, *Biochemical mechanisms of the antitumor activity of sarcolysin*, Cancer chemotherapy Abstr., **1**, 409 (1960).
12. R. S. Young, L. Hurwitz, E. I. Goldenthal, *The effect of chlorambucil on growth and metabolism*, J. Cell. Comp. Physiol., **52**, 353 (1958).
13. S. Oboshi, *Screening of anticancer drugs*, Excerpta Med., Sect. XVI, **9**, 409 (1961).
14. A. Pisani, C. Poggi, G. Meardi, *The effect of nitrogen mustard on the O_2 consumption of leukocytes in chronic myeloid leukemia*, Cancer Chemotherapy Abstr., **1**, 977 (1960).
15. H. Yamagata. *Studies on the influence of anticancer agents on anaerobic glycolysis of malignant tumors*, Cancer Chemotherapy Abstr., **2**, 24 (1961).
16. V. E. Kinsey, W. M. Grant, *Action of mustard gas and other poisons on yeast cells*, Chem. Abstr., **42**, 247 (1948).
17. H. Holzer, H. Kröger, *Mechanism of action of endoxan on Jensen sarcoma and the inhibition of tumor chemotherapy by vitamin nicotinamide*, Klin. Wschr., **36**, 677 (1958).
18. C. G. Schmidt, *Lowering of the DPN concentration in tumours owing to cytostatic drugs*, Klin. Wschr., **37**, 91 (1959).

19. M. F. Sullivan, *The influence of X-irradiation or nitrogen mustard administration on sugar absorbtion.* Radiation Research, **14**, 508 (1961).
20. E. S. G. Barron, G. R. Bartlett, Z. B. Miller, J. Meyer, J. E. Seegmiller, *Effect of nitrogen mustards on enzymes and tissue metabolism*, J. exp. Med., **87**, 503 (1948).
21. K. P. DuBois, J. Deroin, K. W. Cochran, *Influence of nitrogen mustards on citric acid synthesis in vivo*, Proc. Soc. exp. Biol. Med., **81**, 230 (1952).
22. H. Holzer, H. Kröger, P. Scriba, K. Wallenfels, W. Draber, *Karcinostatische Wirkung von Tetraethylen iminobenzochinon*, Angew. Chemie, **70**, 439 (1958).
23. H. Kröger, H. Holzer, *Mechanism of action of ethylene-imine compounds*, Acta Unio Intern. Conta Cancrum, **16**, 686 (1960).
24. J. Pütter, *Metabolic action of triethyleneimino-p. benzoguinone*, Cancer Chemotherapy Abstr., **2**, 133 (1961).
25. H. Holzer, H. Bolze, *Über die Wirkung von nicotinsäure amid auf die Glycolyse-Hemmung von Ascites Tumorzellen durch Aethylenimin-Verbindungen*, Ztschr. Krebsforsch., **64**, 113 (1961).
26. P. Scriba, S. Schneider, H. Holzer, *Zur Wirkung von Bayer A* 139 *auf die Glykolyse von Ascites-Tumorzellen*, Ztschr. Krebsforsch., 63—547 (1960).
27. D. E. Briggs, *Biochemical studies with methanesulfonyl esters*, Biocehm. J., **77**, 186 (1960).
28. N. W. Coles, R. M. Johnstone, J. H. Quastel, *The effects of alkylating agents on the incorporation of glycine* _1_ C^{14} *into tissus proteins in vitro*, Cancer Research, 20, 1 523 (1960).
29. J. A. J. Brouwers, P. Emmelot, *Microsomal N-dimethyllation and the effect of the hepatic carcinogen dimethylnitrosamine on amino-acid incorporation into the proteins of rat livers and hepatomas*, Exp. Cell. Research, **19**, 467 (1960).
30. T. Ebina, M. Kurosu, *Effects of antitumor compounds and radiation on the glycolysis and respiration of ascites tumor cells*, J. natl. Cancer Inst., **20**, 1 023 (1958).
31. C. Davison, R. S. Rozman, L. Bliss, P. K. Smith, *Studies on the metabolic fate of bis (2-chloroethyl) sulfide in the mouse and human*, Proc. Amer. Ass. Cancer Res., 2, 195 (1957).
32. H. George Mandel, *The physiological disposition of some anticancer agents.* Pharmacological Reviews, **11** (4), 744 (1959).
33. Moreshwar Nadkarni, *Preliminary studies on the distribution and fate of TEM, TEPA and myleran in the human*, Cancer Research, **19** (7), 713 (1959).
34. Glynn P. Wheeler, *Studies related to the mechanisms of action of cytotoxic alkylating agents*, Cancer Research, **22** (6), 651 (1962).
35. A. de Barbieri, M. E. Scevola, *Action of sarcolysine on some enzymic systems in normal animals and in animals with sarcoma* 180, Chem. Abstr., **52**, 11 288 (1958).
36. M. Sugawara, *The effect of X-ray and nitromin on the mitotic index and succinic dehydrogenase activity of AH* 130 *and AH* 7974 *ascites hepatomas*, Cancei Chemotherapy Abstr., **2**, 701 (1961).
37. M. Dixon, D. M. Needham, *Biochemical research on chemical warfare agents*, Nature **158**, 432 (1946).
38. A. Gilman, F. S. Philips, *The biological actions and therapeutic applications of the β-Clorethyl amines and sulfides*, Science, **103**, 409 (1946).
39. P. Fracchia, C. Meardi, *The effects of TEM on peroxidase activity of neutrophil granulocytes surviving in vitro*, Cancer Chemotherapy Abstr., **2**, 18 (1961).
40. A. A. Grushina, *Effect of TEPA on the activity of acid and alkaline phosphatases in transplanted rat sarcoma „45"*, Problems Oncol., **3**, 297 (1957).
41. J. M. Roitt, *The mode of action of ethylenimines*, Brit. Emp. Cancer, Cpn, **32**, 19, p. II (1954).
42. S. N. Pradhan, W. L. West, G. M. Baird, J. D. Steward, *Effect of Tio TEPAon the synthesis of protein and nucleic acids in tumor bearing mice*, Cancer Research, **21**, 984 (1961).
43. K. Bullok, *Anticholinesterase activity of ethylenimines and certain other cytotoxic agents*, Biochem. J., **63**, 484 (1956).
44. I. Kițulescu, V. Băluță, T. Rusănescu, *Influența citostaticelor „OCO-54" și „Tio TEPA" asupra proteazelor în splina, ficatul și serul șobolanilor purtători și nepurtători de tumori*, A IV-a sesiune de comunicări științifice ICEF, Buc., 3 iunie 1965.
45. K. P. DuBois, D. F. Petersen, G. R. Zins, *Phosphatase activity of hematopoietic tissue of nitrogen mustard-treated animals.* Proc. Soc. exp. Biol. Med., 91—244 (1956).

46. Kyoichiro Otani, *Effects of nitrogen mustard N-oxide and colchicine on adenosintriphosphatase activity*, Chem. Abstr., **53** (*4*), 3 509 (1959).
47. A. Violante, G. Lorenzutti, A. Ragni, *Modifications of A T P-ase activity of neoplastic and hematopoietic tissues of rats with Oberling and Guérin myeloma in leukemic stage after treatment with sarcochlorin*, Chem. Abstr., **52**, 18 836 (1958).
48. A. Violante, G. Lorenzutti, A. Ragni, *Changes in the transaminase activity of the neoplastic and hematopoietic tissue in rats with myeloma in leukemic stage after treatment with sarcochlorin*, Tumoıi, **43**, 644 (1957).
49. H. Hilz, E. J. Keempten, *Uber die Einwirkung von cytostatischen Verbindungen und nicotinsäureamid auf ascitestumor-ribonuclease*, Biochem. Ztschr., **331**, 563 (1959).
50. G. H. Rathgen, W. Humke, H. Heinrichs, *Zum Wirkungsmechanisms cytostatischen Substanzen*, Chemotherapia, **7**, 33 (1963).
51. Lucia Vlad, Aurora Bandrovski, Jeni Florea, *Efectul chimioterapiei asupra activităţii unor enzime serice în cancerul glandei mamare*, Oncologia şi radiologia, **III** (5), 445 (1964).
52. B. Kabakow, H. Albaum, W. Antopol, G. Blinick, L. Sussman, L. Ginzburg, *Serial enzymes changes in cancer patients undergoing chemotherapy*, Acta Unio Contra Cancrum, **20**, 333 (1964).
53. Aurora Bandrovski, Rodica Coporan, Georgeta Botez, *Urmărirea lactic-dehidrogenazei serice în chimioterapia cancerului*, Comunicare la Soc. de oncologie, U.S.S.M., 28 sept. 1965.
54. Irina Kiţulescu, Gabriela Dinescu, *Relaţia între enzimologie şi chimioterapia cancerului*. Oncologia şi radiologia, **II** (*3*), 201 (1963).
55. K. Tanaka, *Effects of anticancer drugs and riboflavin on aminoacids of tumor tissue*, Cancer Chemotherapy Abstr., **2**, 515 (1961).
56. J. Rychlik, Z. Beránková, F. Sőrm, *The influence of some physiologically active substances on in vitro enzyme synthesis in mouse pancreas*, Collection Czechoslov. Chem. Commun., **24**, 3 163 (1959).
57. K. Kuriaki, L. Hiyoshi, *Leucopenia and decrease in liver glutathion provoked by nitrogen mustard N-oxide and protection by sulfhidryl compounds and nucleic acids and their derivates*, C.R. Soc. Biol., **152**, 1 298 (1958).

ST. CERC. BIOCHIM., 9, 1, 91–105 (1966)

DEGRADAREA PROTEINELOR DE REZERVĂ DIN SĂMÎNȚĂ ÎN PROCESUL GERMINATIV

VICTOR GHEȚIE

545.845

Proteinele din semințele plantelor pot fi împărțite în două categorii distincte, după rolul pe care îl joacă în procesul germinativ : *proteine de rezervă*, cu funcție principală nutritivă, care sînt necesare creșterii și dezvoltării embrionului, și *proteine protoplasmatice**, cu funcție principală structurală și catalitică, care sînt implicate în procesele biochimice specifice.

Proteinele de rezervă se acumulează în endospermul gramineelor și în cotiledoanele leguminoaselor, sub forma unor granule cu dimensiuni diferite, numite *corpi proteici* (*protein bodies*). La semințele gramineelor, în corpii proteici sînt localizate prolaminele, iar în citoplasmă se găsesc albuminele și globulinele [2]. În corpii proteici din cotiledoanele de arahide [3], [4] și de mazăre [5] s-a evidențiat un grup de globuline (la mazăre probabil vicilina și legumina) care diferă prin proprietățile lor fizico-chimice de globulinele și albuminele citoplasmei.

Corpii proteici au o membrană externă distinctă, asociată cu ribozomi, iar în interior au o rețea reticulară [2] (fig. 1). Ei sînt formați din proteine de rezervă (68%), lipide — în majoritatea fosfolipide (22,7%) —, acizi nucleici (5,5%) și acid fitic (4,0%). În afară de acești compuși, s-au pus în evidență aici aminoacizi, aminoacil-ARN, ARN de transfer, enzime de activare ale aminoacizilor, ARN ribozomial, fosfați organici și ATP-fosfoinozitol-fosfotransferaza [6], [7], [8]. Deci, în corpii proteici sînt prezenți toți componenții necesari sintezei proteice, mai puțin ARN-ul mesager, a cărui existență este însă probabilă [9] [10].

Aceste date sugerează ideea că în corpii proteici există un sistem de sinteză proteică distinct și independent de cel din reticulul endoplasmatic. Ultimul concurează la formarea proteinelor protoplasmatice [11]. Rezultă că proteinele de rezervă se deosebesc de cele protoplasmatice nu numai prin funcțiile pe care le îndeplinesc în germinație, ci și prin calea lor diferită de sinteză în cursul coacerii seminței.

1. DESTRĂMAREA CARACTERULUI PROTEIC ÎN CURSUL GERMINAȚIEI

Procesul caracteristic în germinația semințelor este hidroliza proteinelor de rezervă. Acest fenomen are loc în formațiunile de rezervă (endosperm sau cotiledoane) și este acompaniat de transformări profunde la nivelul corpilor proteici care conțin aceste proteine. Transformările studiate de B. Bagley și colab. [3] pe cotiledoanele de arahide germinate sînt sugestiv ilustrate în figura 2.

---

* Alte denumiri uzuale : proteine structurale [1] și, în sens mai restrîns, proteine citoplasmatice [2].

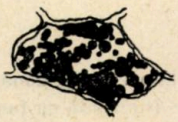
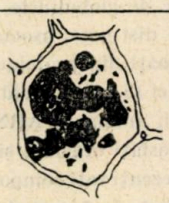
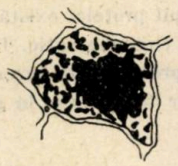
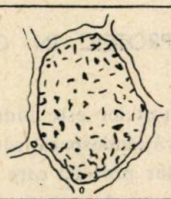
Stadiu de degradare (zile de germinație)	Modificări		Dimensiunile relative (μ) ale corpului proteic sau fragmentului
	Nivel celular	Corp proteic sau fragment	
I 0 zile			2-8
2 4-5 zile			4-15
3 6-7 zile			6-18
4 8-9 zile			0,5-2,0
5 10-12 zile			0,2-1,0

Fig. 2. — Modificările survenite la nivelul celulelor și al corpilor proteici în cursul germinării semințelor de arahide (3).

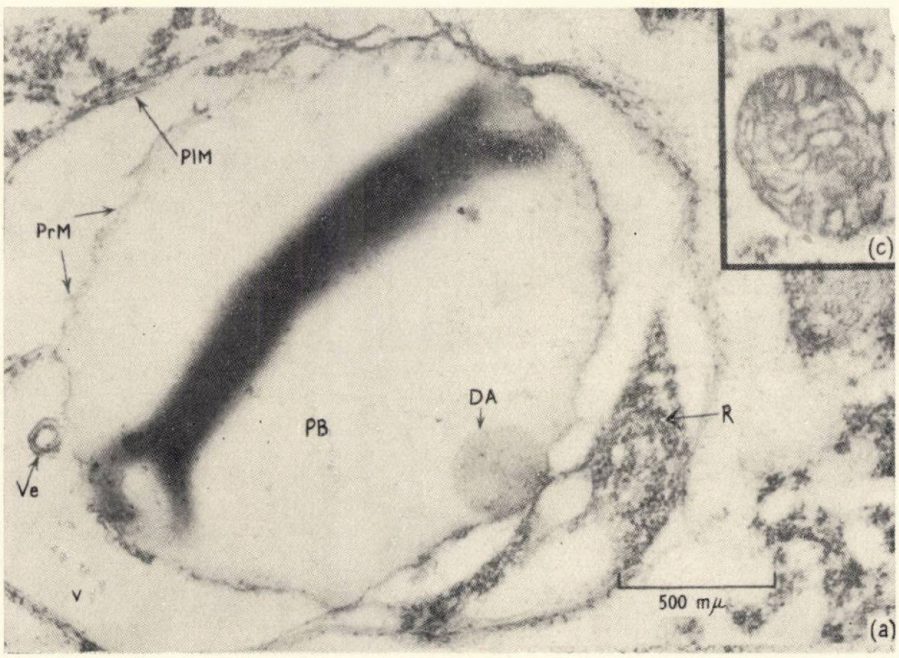


Fig. 1. — Fotografia la microscopul electronic a unei porțiuni din endospermul de grîu (*T. durum*) (2) (reprodusă cu permisiunea dr. I. Raison).

PB = corp proteic; *PrM* = membrana corpului proteic; *PlM* = membrana exterioară a plastidei; *R* = ribozomi; *v* = vacuolă între corpul proteic și membrana exterioară; *Ve* = vezicule; *DA* = suprafață sferică cu densitate electronică uniformă, în interiorul corpului proteic. Umbra neagră în formă de bară, din centrul corpului proteic, reprezintă un artefact; (*a*) = la 19 zile după înflorire; (*c*) = la 22 de zile după înflorire, o altă secțiune.

Se observă că, pe măsură ce germinația avansează, corpii proteici se umflă, prezintă cavități și apoi se rup în fragmente cu dimensiuni din ce în ce mai mici, care sînt digerate și dispar. Este de subliniat că această degradare a corpilor proteici nu are loc simultan în toate celulele cotiledoanelor și se face cu o viteză diferită. Gradul degradării este corelat cu distanța față de cea mai apropiată legătură vasculară (*vascular bundle*). Celulele care sînt mai depărtate de legătura vasculară prezintă cele mai avansate stadii de degradare. Această comportare poate avea cel puțin două cauze : 1) fluxul de hidrolizat proteic, intens în regiunea legăturii vasculare, inhibă sau încetinește schimbările din celulele adiacente acestei regiuni ; 2) lizozomii ce conțin catepsinele se mențin intacți în celulele de lîngă legătura vasculară, pe cînd cei din celulele mai îndepărtate se rup și eliberează catepsinele. Ruperea ar putea fi determinată de lipsa de oxigen sau de substrat, cu atît mai acută cu cît celulele sînt mai îndepărtate de legătura vasculară (Chayen, citat după [3]). În cursul germinației există în cotiledoane o populație de celule eterogenă în raport cu gradul de degradare al corpilor proteici, deci și al proteinelor de rezervă. Această constatare este prețioasă și trebuie să fie luată în considerare atunci cînd se analizează lucrările asupra modificării proteinelor în cursul germinației. Este indiscutabil că, chiar în fazele ultime ale germinației, cînd formațiunea de rezervă este aproape golită de proteinele de rezervă, în anumite regiuni ale ei se găsesc celule care posedă un caracter proteic foarte asemănător — dacă nu chiar identic — cu cel al seminței negerminate. Desigur că proporția celulelor, deci și a proteinelor rămase intacte, sau aproape intacte, este mică, însă detectabilă prin metode sensibile. Astfel, noi am constatat [12] că, în faze foarte avansate ale germinației, în cotiledoanele de bob (*Vicia faba*) pot fi identificate pe cale imunoelectroforetică aproape toate antigenele care sînt prezente în cotiledoanele negerminate.

Hidroliza în formațiunile de rezervă afectează nu numai proteinele de rezervă, ci și pe cele protoplasmatice. Este adevărat însă că rata hidrolizei este mai scăzută la nivelul acestora din urmă. Astfel, la orz s-a constatat că în timp ce hordeina (proteina de rezervă) suferă transformări calitative și cantitative profunde, în schimb la nivelul albuminei și al globulinelor modificările sînt mai puțin importante, deci mai greu decelabile [13]. La leguminoase germinația afectează cantitatea globulinelor, și numai în mică măsură pe aceea a albuminelor [14]. De exemplu la fasole, rata hidrolizei proteinelor, reprezentată în figura 3, arată că în timp ce albuminele sînt hidrolizate lent și constant, globulinele suferă o hidroliză intensă, a cărei viteză și caracteristică variază în timpul germinației [15].

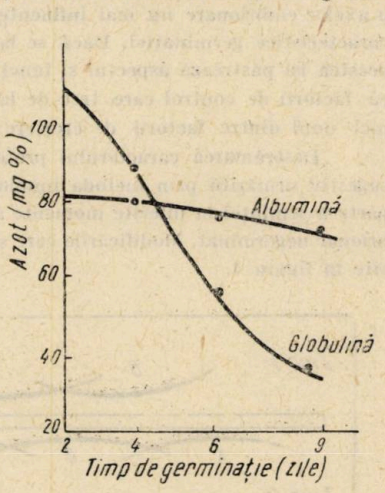


Fig. 3. — Micșorarea cantității de proteine în cotiledoanele de fasole în procesul germinativ [15].

De altfel, la fasole nu toți componenții globulinici sînt scindați în același ritm (date nepublicate), ceea ce se explică prin eterogenitatea funcțională a globulinelor ; cele care aparțin grupei proteinelor protoplasmatice nu sînt afectate de către procesul germinativ în aceeași măsură ca globulinele din grupa proteinelor de rezervă.

Paralel cu hidroliza proteinelor de rezervă, în formațiunile de creștere (axul embrionar) se desfășoară o sinteză proteică intensă, care însoțește procesul creșterii și al diferențierii morfologice a acestei formațiuni. La nivelul axului embrionar, în cursul germinației continuă

în același sens procesele care au început în timpul coacerii și care au fost oprite prin deshidratarea semințelor. Sub acest aspect, singura deosebire o constituie faptul că în cursul coacerii sinteza proteinelor din axul embrionar are loc pe socoteala plantei, pe cînd în cursul germinației sinteza proteică folosește ca sursă principală de aminoacizi substanțele nutritive acumulate în formațiunile de rezervă.

În axul embrionar al semințelor lipsite de endosperm (exalbuminate) se poate desfășura și un proces hidrolitic, care interesează proteinele de rezervă existente și în această formațiune. Faptul că axul embrionar al unor leguminoase poate folosi propriile sale substanțe de rezervă, pentru inițiera diviziunii și diferențiere, rezultă din toate experiențele care au urmărit germinația embrionilor excizați, lipsiți de cotiledoane [16] [17]. Astfel, la semințele de mazăre lipsite de cotiledoane, axul embrionar crește și se dezvoltă timp de 7 zile chiar în medii lipsite de azot [16]. În acest caz, el folosește probabil proteinele de rezervă pe care le posedă într-o anumită cantitate. La lupin, axul embrionar excizat și crescut pe un mediu sintetic crește și se dezvoltă mai încet decît *in situ*, ceea ce arată că dezvoltarea lui depinde într-un mod mai complex de prezența cotiledoanelor [18].

Dar nu numai cotiledoanele influențează dezvoltarea embrionului, ci și invers, procesele metabolice ce se petrec în cotiledoane sînt triate și controlate de factori chimici ce pornesc de la axele embrionare [19]. În absența acestor factori, cotiledoanele de mazăre își pierd controlul respirator și activitatea enzimatică ce caracterizează germinația. Acești factori trec din axele embrionare în cotiledoane în primele ore ale germinației, astfel că îndepărtarea după cîteva ore a axelor embrionare nu mai influențează dezvoltarea în cotiledoane a activităților enzimatice caracteristice germinației. Dacă se lasă o mică bucată de hipocotil atașată de cotiledoane, acestea își păstrează aspectul și funcțiunile normale timp de cîteva săptămîni. Este de notat că factorii de control care trec de la embrion la cotiledoane nu au putut fi identificați cu nici unul dintre factorii de creștere cunoscuți (acid indol-acetic, acid giberelic, kinetină).

Destrămarea caracterului proteic al axului embrionar în cursul germinației poate fi sugestiv urmărită prin metoda imunoelectroforetică, folosind extracte obținute din această parte a seminței în diferite momente ale germinației, și testîndu-le cu un ser imun antiax embrionar negerminat. Modificările care survin în cursul germinației semințelor de bob pot fi urmărite în figura 4.

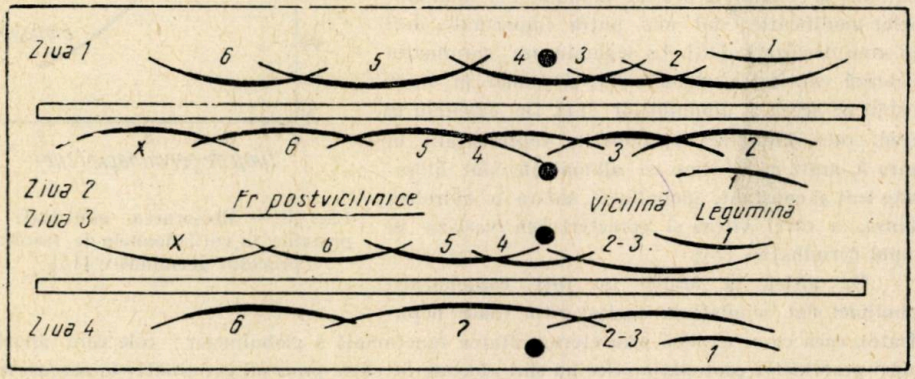


Fig. 4. — Modificări antigenice la nivelul proteinelor din axul embrionar de bob (*Vicia faba*) în primele zile de la începerea germinației (12).
Analiza imunoelectroforetică s-a executat în tampon borat-fosfat la pH = 7,6. În șanțuri s-a introdus un ser imun de iepure antiax embrionar negerminat. Difuzia a durat 4 zile.

Micşorarea rapidă a numărului de antigene este cauzată, desigur, de hidroliza proteinelor. Ruperea structurii antigenice a unui component proteic poate duce însă şi la separarea grupărilor determinante pe molecule cu încărcare electrică diferită şi, în acest caz, numărul de antigene creşte în loc să scadă. Probabil că un astfel de fenomen concurează la apariţia unor antigene efemere, notate pe imunoelectroforeza din figura 4 cu X (ziua a 2-a de germinaţie). Acest mecanism de apariţie a unor antigene noi în cursul germinaţiei se sprijină şi pe datele obţinute prin hidroliza proteinelor *in vitro* [20], [21]. Astfel, prin hidroliza cateptică, albumina serică se poate scinda în trei componenţi, capabili fiecare să reacţioneze cu serul imun de iepure antialbumină, formînd la imunoelectroforeză trei linii de precipitare distincte. Este o dovadă că prin hidroliză se pot scoate la „suprafaţă" grupări determinante care în molecula nativă erau mascate.

2. O IPOTEZĂ ASUPRA MECANISMULUI HIDROLIZEI PROTEINELOR DE REZERVĂ

Dacă dinamica catabolizării proteinelor din sămînţă în cursul germinaţiei s-a bucurat de oarecare atenţie [14], [15], [22], [23], [24], [25], în schimb mecanismul hidrolizei lor şi raportul dintre evoluţia hidrolizei şi apariţia unor caractere proteice tranziţionale nu au fost abordate direct. Totuşi, din lucrările care s-au ocupat cu diferitele aspecte ale metabolismului proteic în germinaţie pot fi extrase materiale experimentale preţioase. Acestea ne conduc la schiţarea unui mecanism ipotetic al procesului, care ar putea contribui la interpretarea fenomenelor ce provoacă destrămarea caracterului proteic al seminţei în germinaţie.

Procesul germinaţiei debutează la nivelul proteinelor prin două transformări timpurii: desfacerea proteinelor din combinaţiile lor cu substanţe neproteice (lipide, glucide, fitină) şi ruperea legăturilor nepeptidice inter- şi intracatenare. Urmează apoi scindarea legăturilor peptidice, care conduce la apariţia fragmentelor de hidroliză.

a) Desfacerea complexelor

Proteinele de rezervă sînt depuse în corpii proteici sub formă de combinaţii chimice mai mult sau mai puţin puternice cu fitina şi lipidele [7]. Faptul că noi am găsit ataşate de proteina majoritară din sămînţa de fasole cantităţi însemnate de glucide neutre şi acide [26] conduce la concluzia că în corpii proteici proteina de rezervă ar putea exista sub forma unor combinaţii lipo-gluco-proteice [27], (28]. Desfacerea acestor cunjugate proteice în cursul germinaţiei este sugerată de experienţele lui J. Mikola şi colab. [29], care au studiat efectele păstrării asupra extractelor proteice din seminţele de orz. Autorii constată că, păstrînd extractele cîteva zile la temperatura de 4°C, viscozitatea lor scade, iar cantitatea de fosfor anorganic din soluţie creşte. Primul fenomen este interpretat ca fiind cauzat de desfacerea atît a polizaharidelor cît şi a fitatului de molecula proteică, iar al doilea fenomen ca fiind cauzat numai de desfacerea fitatului de molecula proteică. Pe măsură ce aceste două fenomene avansează, separările electroforetice sînt din ce în ce mai bune. Astfel, un extract de orz analizat după 1—2 ore de la extracţie dă o imagine neclară, în timp ce după o păstrare de 2—7 zile la frigider se observă o separare netă în 8 componente. Această observaţie este întărită de altfel şi de analiza pe care autorii o fac şi altor lucrări. Experienţele autorilor pot fi corelate cu constatarea făcută în laboratorul nostru, că analiza electroforetică a extractelor obţinute din seminţele de fasole, mazăre şi bob, aflate în faze foarte timpurii ale germinaţiei, arată o îmbunătăţire netă a rezoluţiei, concomitent cu scăderea încărcării în glucide a unor componente electroforetice (date nepublicate). Îmbunătăţirea rezoluţiei electroforetice în procesul germinativ am găsit-o menţionată şi într-o lucrare efectuată

asupra proteinelor din endospermul semințelor de porumb, aflate însă într-o fază mai avansată a germinației [30].

Se poate presupune deci că în procesul germinativ, combinațiile fitină-proteină se desfac treptat. Felul în care sînt influențate proprietățile componentelor proteice eliberate de fitină poate fi judecat din lucrarea lui A. K. Smith și J. J. Rackis (31), care au arătat că eliminarea fitinei din extractele apoase ale făinei de soia determină dispariția unor componente electroforetice, iar punctul izoelectric al proteinei totale crește. Aceste rezultate sugerează că fitina ar putea lega împreună, în diferite raporturi, unități proteice de un singur fel sau foarte asemănătoare. Această interpretare a datelor se sprijină pe rezultatele obținute de R. K. Morton și J. K. Raison [7], care dovedesc că în celule combinația fitină-proteină există ca atare și nu este un artefact rezultat la extragere, așa cum consideră A. R. Smith și J. J. Rackis [31].

b) Scindarea legăturilor nepeptidice

O dată eliberate din aceste combinații, sau poate chiar înainte de eliberarea lor, moleculele proteinelor pot fi scindate, fără a se desface însă legăturile peptidice. Dacă proteinele de rezervă sînt alcătuite din lanțuri polipeptidice legate prin punți disulfidice, atunci scindările se pot petrece la nivelul acestora. Această presupunere se bazează pe datele lui A. N. Sutulov [32], [33], care a observat că în primele ore ale germinației semințele de lupin (*Lupinus luteus*) prezintă o reacție puternică la nitroprusiat, ceea ce indică apariția unor grupări sulfhidrilice libere. Ruperea punților disulfidice și descompunerea moleculelor proteice complexe în molecule mai mici au fost constatate și în cursul stratificării semințelor de migdal [34] și al iarovizării semințelor de grîu [35], [36].

În semințele germinate, ca de altfel și în alte organe ale plantelor, există o enzimă capabilă să catalizeze reducerea legăturilor disulfidice ale proteinelor. M. Hatch și J. Turner [37] au izolat și purificat această enzimă din semințele de mazăre, bob, orz, porumb și grîu germinate timp de 5—7 zile în nisip. Ea este capabilă să reducă grupările disulfidice ale proteinelor cu ajutorul di- și trifosfopiridinnucleotidului. Acțiunea enzimei poate să se exercite și asupra legăturilor disulfidice ale unor enzime (dehidrogenaza aldehidei 3-fosfoglicerice), avînd astfel o intervenție mai largă în procesul germinativ.

Studiul greutății moleculare a glutelinei din grîu înainte și după ruperea legăturilor disulfidice pe cale chimică, *in vitro*, a arătat că glutelina este un sistem polidispers, cu un spectru de greutate moleculară cuprins între valori de ordinul zecilor de mii și milioanelor [38]. După ruperea legăturilor disulfidice, greutatea moleculară scade în jur de 20 000, viscozitatea intrinsecă se reduce considerabil (de la 0,68 la 0,18), iar eterogenitatea dispare [39], [40]. În semințele de soia, D. Briggs și W. Wolf [41] au identificat de asemenea proteine capabile să formeze polimeri legați prin punți disulfidice. Scăderea greutății moleculare, concomitent cu micșorarea eterogenității, poate fi realizată și la aceste proteine cu agenți reducători, ca mercaptoetanolul, sulfitul de sodiu, capabili să rupă legăturile disulfidice. Aceste date arată că în semințele plantelor există componenți proteici principali, alcătuiți din unități polipeptidice legate între ele prin legături disulfidice, și că acestea sînt susceptibile de reducere în condițiile germinării semințelor.

Scindările nedestructive pot să intereseze și legăturile de hidrogen care unesc lanțurile polipeptidice ale unei molecule proteice. Astfel, vicilina și legumina din semințele de mazăre pot fi desfăcute în lanțurile polipeptidice componente cu ajutorul unor agenți disocianți, cunoscuți ca acționînd asupra legăturilor de hidrogen (ureea, formamida și dodecilsulfatul) [42]. Desfacerea vicilinei și a leguminei cu ajutorul dodecilsulfatului determină apariția unei eterogenități electro-

foretice marcate, deşi analiza prin ultracentrifugare indică prezenţa unui singur component cu greutate moleculară mai mică. Eterogenitatea electroforetică poate fi cauzată de disociaţia incompletă şi întîmplătoare a lanţurilor polipeptidice şi de capacitatea lor diferită de legare a dodecilsulfatului (fig. 5).

Se formează astfel un număr însemnat de benzi electroforetice pentru ambele proteine. Ele nu reprezintă însă tot atîtea lanţuri polipeptidice, deoarece — aşa cum consideră autorii acestor experienţe — fiecare subunitate rezultată din disociaţia incompletă a moleculei poate avea o capacitate diferită de legare a dodecilsulfatului, şi poate migra deci cu o viteză diferită, determinînd astfel complexitatea mare a electroforegramelor *.

Desfacerea legăturilor de hidrogen care unesc lanţurile polipeptidice poate constitui un proces real la nivelul proteinelor de rezervă. În favoarea admiterii unui astfel de proces pot fi aduse acele părţi din lucrările lui N.A. Radionova care sunt consacrate studiului proprietăţilor fizico-chimice ale proteinelor de rezervă rămase nehidrolizate în diferite faze ale germinaţiei [22] [23] [44]. Autoarea observă că vicilina rămasă nehidrolizată în a 4-a şi a 8-a zi de germinaţie diferă de vicilina din sămînţa negerminantă prin cantitatea azotului aminic, rotaţia specifică, viscozitatea relativă, capacitatea de reţinere a apei şi eterogenitatea curbelor de salifiere (numărul punctelor de inflexiune).

c) Hidroliza legăturilor peptidice

Ruperea legăturilor disulfidice sau a celor de hidrogen poate fi un proces preliminar care aduce molecula într-o formă mai uşor de atacat de către proteazele intracelulare. Apariţia grupărilor SH este considerată în lucrări mai vechi ca indicînd o denaturare a substanţelor proteice, etapă preliminară considerată necesară pentru proteoliză [45]. Fără a contrazice acest punct de vedere, el poate fi completat cu presupunerea că ruperea legăturilor disulfidice „scoate la suprafaţă" legături peptidice susceptibile de a fi atacate de enzimele proteolitice, dar mascate în molecula intactă. O astfel de comportare se observă la hidroliza gamma-globulinelor cu papaina [46]. Scindarea moleculei nu reuşeşte decît în prezenţa cisteinei sau a unui alt agent reducător capabil să desfacă legătura disulfidică, responsabilă de structura compactă a moleculei. Mai mult, unul dintre fragmentele care rezultă în urma acţiunii papainei nu poate fi atacat mai departe de tripsină decît după ruperea prealabilă a unor alte legături disulfidice intercatenare [47].

În paralel cu acest proces de „activare a proteinelor" are loc şi activarea proteazelor. Acest ultim proces are loc imediat ce celulele formaţiunilor de rezervă se îmbibă cu apă. Hidroliza proteinelor de rezervă apare astfel ca un fenomen precedat de o dublă activare şi care începe în timp numai după ce ambele procese de activare ating un nivel critic. Aşa se poate explica existenţa unei perioade de „amorsare" a hidrolizei proteinelor de rezervă, constatată de numeroşi autori. Astfel, C. E. Danielsson [14] constată la sămînţa de mazăre o hidroliză puternică a proteinelor abia în a 5-a zi de la punerea seminţelor în condiţii de germinaţie.

---

* D. Grant şi S. Lawrence (42) dau un exemplu sugestiv. Dacă molecula este alcătuită din 6 lanţuri polipeptidice, de 3 tipuri diferite, A, B şi C, atunci proteina poate fi reprezentată sub formula $A_2\ B_2\ C_2$. În prezenţa dodecilsulfatului (DS), complexul se disociază astfel:

$$A_2B_2C_2 + xDS \rightarrow A_2\,(DS)_m + AB\,(DS)_n + AC\,(DS)_0 + B_2\,(DS)_p + \ldots$$

Nu toate subunităţile teoretice sînt posibile. Felul lanţurilor din subunităţi va depinde de poziţia relativă a lanţurilor polipeptidice în moleculă. Vicilina ar avea 3 lanţuri polipeptidice, fiecare cu o greutate moleculară de 58 000, lar legumina ar fi alcătuită prin unirea a 12 lanţuri, cu o greutate moleculară de 33 000 [43].

Numeroși autori au constatat că în procesul de germinație activitatea proteazelor crește considerabil. Lucrările respective au fost prezentate de N. A. Kudriașova [48] într-un articol de sinteză, de aceea nu ne vom opri la ele. Vom insista numai asupra faptului că în semințe pot să existe atît enzime de tip papainic, care sînt activabile prin substanțe reducătoare și acționează la pH-uri acide și neutru, cît și enzime de tip triptic, indiferente la substanțele reducătoare și capabile să efectueze proteoliza la pH-uri alcaline. Astfel, în semințele de mazăre s-au evidențiat două tipuri de proteaze : una care are pH-ul optim cuprins între 5,0 și 5,5 [49] și cealaltă care poate hidroliza o soluție de cazeină chiar la pH-ul 8 [50]. De asemenea, în semințele de bob s-au pus în evidență 3 proteaze, dintre care două au maximum de activitate în zona acidă (2,0 și 4,2), iar una în zona alcalină (7,9) [51]. Aceste rezultate, ca și altele necitate [46], lasă să se întrevadă că hidroliza proteinelor de rezervă se petrece în urma acțiunii a cel puțin două tipuri de enzime proteolitice. Din păcate, datele existente pînă în prezent nu permit să se facă nici un fel de aprecieri în legătură cu succesiunea intervenției acestora în procesul germinativ și cu măsura în care participarea lor este dependentă de variația pH-ului intracelular. Mai mult, nu se poate afirma cu siguranță că toate semințele conțin ambele tipuri de enzime proteolitice.

Controlul hidrolizei proteinelor de rezervă poate avea loc prin însăși natura mecanismului de activare a proteinelor. În celulele din apropierea legăturii vasculare, hidroliza nu ar putea avea loc chiar dacă lizozomii ar ceda enzimele proteolitice [3], deoarece, datorită oxigenării puternice, legăturile disulfidice ale moleculelor proteice nu se pot desface. În celulele mai depărtate de legătura vasculară, oxigenul este sub concentrația inhibitoare, iar reducerea legăturilor disulfidice poate avea loc. De fapt, reducerea poate interesa atît substratul, cît și enzima proteolitică, creînd condițiile pentru hidroliză.

d) Frangmentele de hidroliză

Ca rezultat al acțiunii enzimelor pot să apară fragmente de hidroliză ale proteinelor de rezervă, cu o greutate moleculară de ordin inferior. Acești produși de hidroliză, aparent fără nici o funcție celulară, pot să se păstreze un timp variabil în sămînță, imprimîndu-i un caracter proteic tranzițional. Astfel de compuși au fost semnalați de N. A. Radionova la sămînța de năut în a 8-a zi de germinație [22] [23], ca și de noi la sămînța de fasole în a 6-a zi de germinație [15]. Cantitatea relativ mare în care apar acești componenți noi (14 % din proteina totală la fasole) ne determină să-i considerăm ca provenind din globulinele de rezervă, în ciuda proprietății lor de a fi solubili în apa distilată. Constatări similare am făcut și la cotiledoanele de floarea-soarelui (date nepublicare). După ieșirea cotiledoanelor din pămînt și înverzirea lor, se constată apariția unei fracțiuni electroforetice noi, cu mobilitate medie, care apoi dispare treptat, pe măsură ce cotiledoanele se usucă. Apariția unui produs de hidroliză bine caracterizat electroforetic am semnalat-o și în axul embrionar al semințelor de bob germinate 11 zile [12] [52], (fig. 6 ; vezi și fig. 4).

Aceste rezultate arată că în primele etape ale hidrolizei proteinele de rezervă se scindează în fragmente mai mari, care într-o etapă ulterioară sînt hidrolizate (de alte tipuri de enzime proteolitice ?) la peptide mici și aminoacizi. Cum aceste două procese pot decurge aproape simultan, este posibil ca numai în anumite momente ale germinației să se poată evidenția fragmente de hidroliză. Această precizare explică datele acelor autori care n-au constatat în cursul germinației vreo modificare a eterogenității proteinelor studiate.

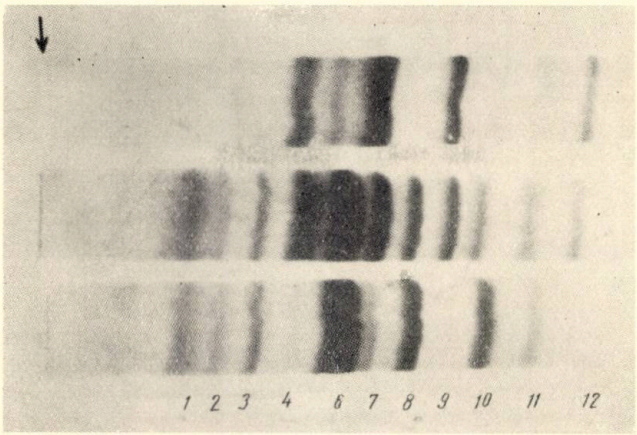


Fig. 5. — Compararea proteinogramelor vicilinei, globulinelor amestecate şi leguminei (de sus în jos) obţinute prin electroforeză în gel de poliacrilamidă în prezenţă de dodecilsulfat-(42) (reprodusă cu permisiunea dr. D. Grant). Fracţiunea 5 nu se observă clar în fotografie. Analiza electroforetică s-a efectuat în tampon veronal pH=8,5, care conţine 0,25% (g/v) dodecilsulfat.

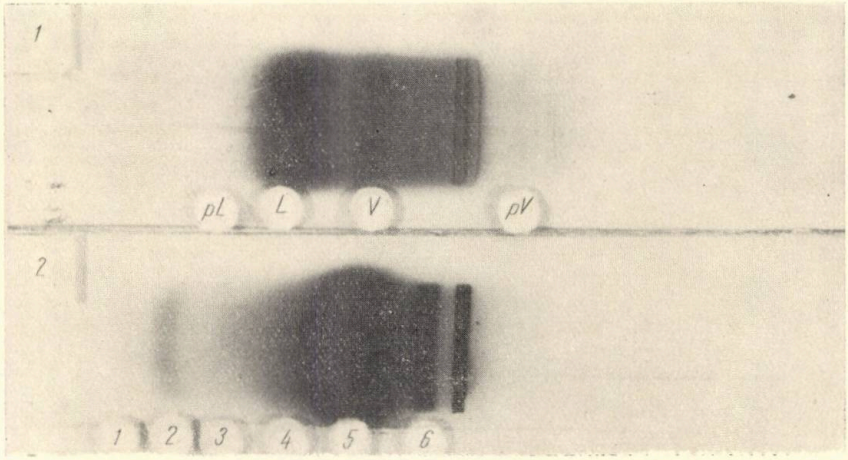


Fig. 6. — Apariţia unui produs de hidroliză (fracţiunea 6) în axul embrionar al seminţelor de bob germinate 11 zile (12). Analiza electroforetică s-a executat în tampon borat-fosfat la pH = 7,8.

1. Proteine din axul embrionar negerminat. *2*. Proteinele din axul embrionar germinat 11 zile. *pL* = fracţiuni preleguminice; *L* = legumina; *V* = vicilina; *pV* = fracţiuni postvicilinice. *1–5* = fracţiuni proteice nou apărute în axul embrionar germinat. *6* = fragment de hidroliză (22% din proteinele totale în ziua a 11-a. 6% în ziua a 14-a şi dispare în ziua a 18-a).

3. PROCESE SINTETICE ÎN FORMAȚIUNILE DE REZERVĂ

În acele părți ale seminței în care are loc hidroliza proteinelor de rezervă, sînt prezente și procese sintetice, care concurează, probabil, la înzestrarea celulelor cu echipamentul enzimatic necesar efectuării și desăvîrșirii proceselor biochimice care determină germinația.

Numeroase lucrări atestă formarea enzimelor la nivelul formațiunilor de rezervă în cursul germinației. Astfel, la *Secale vulgare* și *Phaseolus mungo* s-a semnalat creșterea treptată a activității peroxidazei și polifenoloxidazei în procesul germinativ [53]. Ultima activitate nu a fost observată în sămînța negerminată. Izonitrit-liaza [54] este absentă în cotiledoanele arahidelor și se dezvoltă aici între zilele 2 și 4 de germinație. Această observație a fost verificată și pe cotiledoanele excizate și menținute în condiții sterile de germinație. I. H. Cherry [55], folosind tot cotileodane de arahide, a constatat că în primele 8 zile ale germinației are loc o creștere a activității respiratorii, a structurii și organizării interne a mitocondriilor, ca și a unor enzime localizate aici, concomitent cu o triplare a conținutului în acizi nucleici. Aceste procese sintetice se desfășoară pe fondul unor procese hidrolitice interne care determină o pierdere de 60% din greutatea seminței și de 70% din proteinele acesteia. După 8 zile de germinație, acizii nucleici și activitățile enzimatice scad rapid, iar mitocondriile se umflă și se dezintegrează în număr mare.

Aceste experiențe, ca și altele de acest fel (de exemplu [56]), nu demonstrează însă că în cotiledoane ar avea loc o sinteză proteică *de novo*, deoarece creșterea activității enzimatice poate fi pusă și pe socoteala unei activări sau deblocări intracelulare. Mai concludente din acest punct de vedere ni se par lucrările lui I. L. Young, I. E. Varner și colab. [57], [58], [19], care au tras concluzia că, în semințele de mazăre germinate, creșterea activității enzimatice, a fosfatazei și a amilazei este rezultatul unei sinteze proteice nete, bazîndu-se pe următoarele fapte: 1. Creșterea activității enzimatice este prevenită prin inhibiția sintezei proteice cu cloramfenicol și p-fluorfenilalanină. 2. Se pot izola din cotiledoane mitocondrii active pînă la a 10-a zi de la germinație, ceea ce arată că există mecanismele care furnizează energie pentru sinteza proteică. 3. Fracțiunea microzomială a cotiledoanelor este capabilă să încorporeze *in vivo* și *in vitro* ^{14}C-glicina în proteină pînă la a 10-a zi de germinație *. În sfîrșit, A. Marcus și J. Feeley [62] au arătat recent că și în cotiledoanele de arahide îmbibate are loc o sinteză proteică netă; activitatea sistemului ribozomial izolat crește de la un nivel scăzut în sămînța uscată la un maxim în sămînța îmbibată, creșterea fiind asociată cu formarea polizomilor.

Inițierea sintezei proteice în cotiledoane este dependentă de prezența axului embrionar. Dacă țesutul axial este îndepărtat din sămînța uscată și cotiledoanele se pun în condiții de germinație, nu se constată o creștere a activității fosfatazelor și amilazei. Această incapacitate enzimatică nu se datorește însă lezării cauzate de disecție, deoarece, dacă excizia se face la 48 de ore după îmbibare, activitatea enzimatică este asemănătoare în cotiledoanele din sămînța intactă și din cea excizată (tabela 1).

---

* Young și colab. [58] mai aduc și un alt argument, citînd lucrările lui Webster [59], [60], care a arătat că ribozomii izolați din mazărea germinată sînt capabili de sinteza netă a proteinelor solubile. Dar aceste date nu pot fi aduse în sprijinul părerii că în cotiledoane există o sinteză proteică netă, deoarece Webster a lucrat pe plantule de mazăre în vîrstă de 3 zile, lipsite de cotiledoane [59]. De altfel, nici chiar pe aceste preparate nu s-au putut repeta experiențele lui Webster, demonstrîndu-se doar o pierdere de proteină solubilă de pe ribozomi [61].

Tabela 1

Activitatea enzimatică în cotiledoanele de mazăre germinate, intacte (*i*) și cu axul embrionar excizat înainte (e_1) sau la 48 de ore (e_2) după imbibiție (adaptat după (58))

Zile de germinație	Activitatea enzimatică în variantele:		
	i	e_1	e_2
	ATP-aza (în μ moli)		
1	0,15	0,15	1,10
2	0,75	0,00	2,90
5	1,70	0,07	1,40
	PP-aza (în μ moli)		
1	1,1	0,9	1,6
2	1,9	1,1	3,3
5	3,4	1,1*	2,0
	Amilaza (în mg de glucoză)		
1	0,04	0,04	0,10
2	0,12	0,04	0,13
5	0,20	0,10	0,67*

* Valorile au fost obținute la 4 zile de germinație.

Țesutul axial influențează sinteza proteică în cotiledoane probabil prin intermediul funcției mitocondriale. Astfel, mitocondriile din cotiledoanele excizate înainte de imbibiție pierd capacitatea de a lua oxigenul și de a face fosforilarea oxidativă. Pierderea funcțiunii este provocată de eliberarea unor cofactori din mitocondrii; activitatea mitocondriilor se restabilește dacă li se adaugă fracțiunea supernatantului dintr-un extract de cotiledoane.

Aceste rezultate arată că „multe dintre evenimentele metabolice care se petrec în cotiledoane în cursul germinației semințelor de mazăre sînt triate și controlate de semnale care vin de la axul embrionar (de creștere). În absența acestor semnale, cotiledoanele suferă un rapid declin respirator și devin incapabile să-și dezvolte acele activități enzimatice care sînt caracteristice semințelor de mazăre germinate. Odată semnalele recepționate, respirația și activitatea fosfatazică și amilolitică se desfășoară ca și în timpul germinației, chiar dacă cotiledoanele sînt excizate. Deoarece cotiledoanele nu mai sînt atașate de axul embrionar, este evident că nu mai poate avea loc transportul obișnuit al produselor de hidroliză a amidonului, proteinelor și acizilor nucleici. În ce măsură lipsa translocării inhibă hidroliza proteinelor nu a fost arătat pînă în prezent" [58].

4. TRANSLOCAȚIA EXTRASEMINALĂ A MACROMOLECULELOR

Dezvoltarea vertiginoasă a noilor țesuturi vegetale și sinteza proteinelor legate de acest proces necesită, fără îndoială, colaborarea acizilor nucleici. Cercetările întreprinse în această direcție au ajuns la concluzia că există o proporționalitate între degradarea acizilor nucleici în părțile de rezervă ale semințelor și formarea lor în părțile de creștere (axul embrionar) [63—68]. Astfel, Z. Šormova și F. Šorm [63], urmărind variația acizilor ribo- și dezoxiribonucleici în coti-

ledoane, în părţile axiale şi în sistemul radicular al seminţelor de mazăre în timpul germinaţiei timpurii, au observat, pentru ambii componenţi, că în primele zile scăderea lor în părţile de rezervă coincide cu creşterea lor în părţile de creştere (fig. 7).

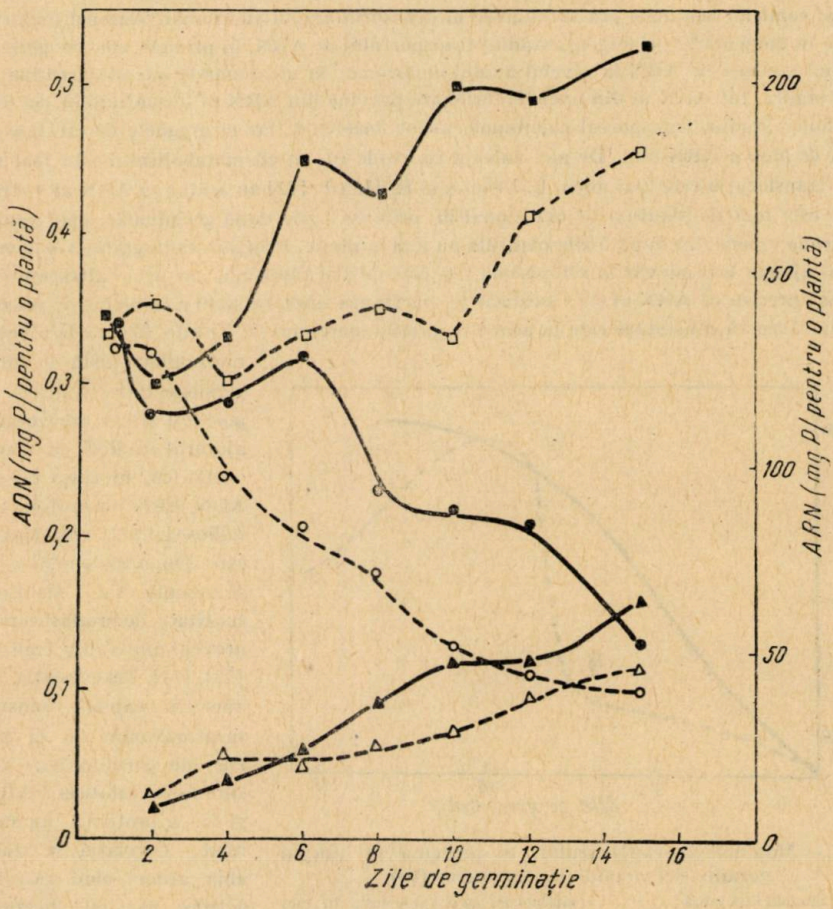


Fig. 7. — Variaţia cantităţii acizilor nucleici în seminţele de mazăre în cursul germinaţiei (după datele lui Z. Šormova şi F. Šorm [63]).

——— ADN – – – – ARN

□ ■ = planta întreagă; ○ ● = cotiledoane; △ ▲ = radicula. În tulpiniţă variaţia acizilor nucleici are acelaşi sens ca în radiculă.

După O. Yukito [68] şi autorii experienţelor de mai sus [63], această comportare se explică prin translocaţia acizilor nucleici, sau a componentelor lor, din organele de rezervă în părţile axiale ale seminţei. Mecanismul acestei translocaţii a fost sugerat de O. Yukito [68], care consideră că în timpul germinaţiei are loc o scindare în etape a ribozomilor. Ea ar decurge astfel: ribozomi intacţi → ARN separat de partea proteică → degradarea ARN-ului → ARN liber cu dimensiuni moleculare mici, „expulzat" în citoplasma solubilă („ARN transferabil"). Acest ARN ar putea fi transportat la părţile cu creşterea activă, pentru a fi utilizat la reconstituirea

ribozomilor. Prin electroforeză [64] și ultracentrifugare [69] s-a semnalat existența unui ARN transportabil, avînd un coeficient de sedimentare de 4 S și alcătuit din baze azotate care coincid cu cele ale ARN-ului din microzomi și diferă de cele ale ARN-ului solubil. L. Ledoux [70], [71] a întregit această ipoteză, arătînd experimental că produșii metabolici finali macromoleculari ai celulelor seminale pot să migreze în interiorul axului embrionar. Autorul împarte germinația în două stadii principale : stadiul transportului de ARN, în primele zile de germinație, și stadiul sintezei de ARN la nivelul axului embrionar, în următoarele zile ale germinației. În primul stadiu, tot ARN-ul din axele embrionare provine din ARN-ul formațiunilor de rezervă. În al doilea stadiu, transportul macromoleculelor încetează, iar în organele de creștere începe sinteza *de novo* a ARN-ului. De aici autorul conchide că, cu cît metabolismul este mai intens, cu atît translocația este mai mică. L. Ledoux și R. Huart [72] au arătat că ARN-ul extras din drojdie este luat de plantula de orz numai în primele 3 zile după germinație, apoi cantitatea luată scade repede, iar după 5 zile plantula nu mai ia nimic. Prin autoradiografie s-a dovedit că ARN-ul ajunge într-adevăr în citoplasma din coleoptil și rădăcină, iar prin ultracentrifugare s-a putut preciza că ARN-ul este localizat în fracțiunea microzomială a celulelor de coleoptil și radiculă. Această constatare este în acord cu presupunerea lui O. Yukito [68] că la nivelul microzomilor există o interconversiune între ARN-ul transportabil și cel ribozomal. Cu ajutorul iradierii cu raze X s-a arătat că, în timp ce sinteza ADN, ARN și a proteinelor este radiosensibilă, translocația nu este. După iradiere, în coleoptil și radiculă s-a menținut o cantitate de produși care poate proveni numai din translocație [73], [74]. Translocația acizilor nucleici explică constatarea surprinzătoare că, în primele zile ale germinației, în axul embrionar sinteza ARN-ului și cea a proteinei nu sînt corelate. Corelația se stabilește abia atunci cînd translocația acizilor nucleici încetează și începe sinteza lor *de novo* în celulele de creștere.

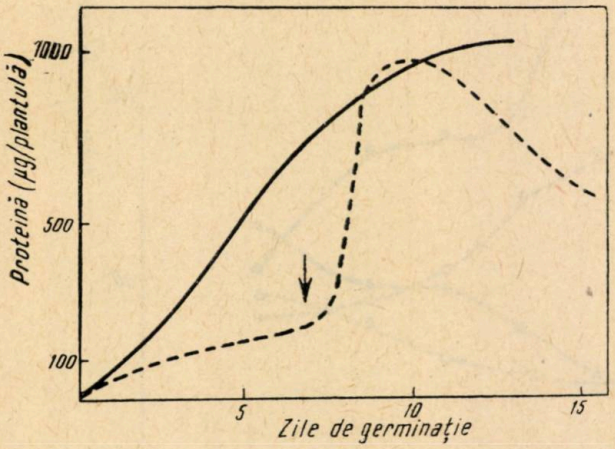


Fig. 8. — Modificarea conținutului în proteină în timpul germinației orzului la întuneric (65).

——— sămînță fără coajă ; – – – – sămînță cu coajă ↓ momentul în care coleoptilul străpunge tegumentul seminței.

Experiențele lui L. Ledoux și ale colaboratorilor săi au dovedit că macromoleculele pot fi transferate de la o celulă la alta, fără a suferi în prealabil modificări structurale severe. Totodată, s-a arătat că translocația nu se limitează numai la ARN, ci cuprinde și ADN-ul și proteinele. Existența unui transport de macromolecule proteice de la părțile de rezervă la cele de creștere (axul embrionar) se sprijină în principal pe faptul că, în primele zile de la germinație, în coleoptilul, radicula și semințele de orz pot pătrunde cantități însemnate de proteine cu greutate moleculară cuprinsă între 15 000 (lizozim) și 87 000 (conalbumină) [75], [76]. De asemenea s-a arătat că, în mod neașteptat, creșterea ratei conținutului proteic în coleoptilul de orz este de trei ori mai mare dacă creșterea este întîrziată (prin prezența cojii) decît dacă coaja se îndepărtează în prealabil [65] (fig. 8).

Această comportare sugerează de asemenea că ar putea exista o translocație de proteină din unele părți ale seminței spre coleoptil. Perioada de „lag" corespunde solubilizării proteinei în sămînță, iar creșterea proteinei în coleoptil este rezultatul unui transfer de proteină și nu al unui proces sintetic. Experiența arată că în primele zile de la germinație ar putea exista un transfer de proteină nehidrolizată sau parțial hidrolizată de la sămînță la axul embrionar. Deși nu se cunoaște rolul pe care-l îndeplinește proteina transferată, și nici soarta ei ulterioară, această posibilitate trebuie să fie în atenția celor care studiază modificările timpurii ale caracterului proteic la nivelul țesutului de creștere.

CONCLUZII

Scăderea progresivă a conținutului de proteine din semințe în procesul germinativ este cauzată de hidroliza proteinelor de rezervă. Scindarea legăturilor peptidice se realizează numai după o prealabilă „activare" a proteinelor, care implică modificarea structurii native a acestora. Activarea are loc în fazele timpurii ale germinației și se realizează prin mai multe căi, independente sau succesive : desfacerea conjugatelor proteice, depolimerizarea asociațiilor moleculare și disocierea moleculelor în lanțurile polipeptidice componente. În aceste forme moleculare, proteinele de rezervă sînt atacate și hidrolizate de proteazele de tip papainic și triptic, existente în sămînța germinată și care acționează într-o succesiune determinată. Hidroliza proteinelor avansează pînă la nivelul peptidelor cu greutate moleculară mică și al aminoacizilor, dar, în anumite momente ale germinației, se pot pune în evidență și fragmente de hidroliză cu greutate moleculară mai mare. Viața efemeră a acestor fragmente se explică fie prin distrugerea lor rapidă de către enzimele proteolitice, fie prin translocarea lor extraseminală la nivelul țesuturilor de creștere.

Prezentat la redacție
la 19 octombrie 1965

Institutul de biochimie al
Academiei Republicii Socialiste România

BIBLIOGRAFIE

1. J. Kloz, V. Turkova, E. Klozova, Biol. Plant. (Praga), **2**, 126 (1960).
2. R. K. Morton, B. A. Palk, J. K. Raison, Biochem. J., **91**, 522 (1964).
3. B. W. Bagley, J. H. Cherry, M. L. Rollins, A. M. Altschul, Amer. J. Bot., **50**, 523 (1963).
4. A. M. Altschul, J. E. Snowden, D. D. Mauchon, J. M. Decharry, Arch. biochem. biophys., **95**, 402 (1961).
5. J. E. Varner, G. Schidlowsky, Plant Physiol., **38**, 139 (1963).
6. R. K. Morton, J. K. Raison, J. R. Smeaton, Biochem. J., **91**, 539 (1964).
7. R. K. Morton, J. K. Raison, Nature, **200**, 429 (1963).
8. — — Biochem. J., **91**, 528 (1964).
9. L. Dure, L. Waters, Science, **147**, 410 (1965).
10. J. S. Graham, R. K. Morton, J. K. Raison, Austr. J. Biol. Sci., **17**, 102 (1964).
11. J. D. Graham, A. C. Jennings, R. K. Morton, B. A. Palk, J. K. Raison, Nature, **196**, 967 (1962).
12. V. Gheție, L. Buzilă, Biol. Plant. (Praga), **5**, 203 (1964).
13. G. Biserte, R. Scriban, Bull. Soc. Chim. Biol., **32**, 959 (1950).
14. C. E. Danielsson, Acta chem. scand., **5**, 541 (1951).
15. V. Gheție, St. cerc. biochim., **2**, 293 (1959).
16. G. Goas, C.R. Acad. Sci., **249**, 2383 (1962).
17. G. Goas, Bull. Soc. Franç. physiol. veget., **6**, 92 (1960).

18. J. Czosnowski, Acta Soc. Bot. Polon., **31**, 693 (1962).
19. J. E. Varner, L. V. Balace, Plant. Physiol., **38**, 89 (1963).
20. C. Lapresle, Bull. Soc. Chim. Biol., **37**, 969 (1958).
21. M. Kaminski, Exp. ann. Biochim. méd., **22**, 85 (1960).
22. N. A. Rodionova, Biul. Glavn. Bot. Sada, **28**, 56 (1957).
23. — Tr. Glavn. Bol. Sada, **7**, 32 (1960).
24. K. Kondo, M. Shigeki, M. Kajima, Bull. Res. Instit. Food Sci. Kyoto Univ., **13**, 49 (1954).
25. B. Moraweczka, Acta Biochim. Polonica, **8**, 313 (1961).
26. V. Gheție, L. Buzilă, St. cerc. biochim., **4**, 241 (1961).
27. W. G. Jaffé, K. Hannig, Arch. biochem. biophys., **109**, 80 (1965).
28. K. Hochstrasser, Z. Physiol. Chem., **333**, 99 (1963).
29. J. Micola, M. Nummi, T. E. Enari, Nature, **195**, 808 (1962).
30. V. Alexandrescu, St. cerc. biochim., **5**, 399 (1962).
31. A. K. Smith, J. J. Rackis, J. amer. chem. Soc., **79**, 633 (1957).
32. A. N. Sutulov, DAN SSSR, **79**, 633 (1957).
33. H. S. Mckee, *Protein metabolism in ripening and dormant seeds and fruits*, în W. Ruhland, *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1958, **VIII**, 581.
34. A. V. Blagoveșcenski, I. P. Ivanova, DAN SSSR, **100**, 511 (1955).
35. A. V. Blagoveșcenski, G. A. Kirilova, DAN SSSR **99**, 1065 (1954).
36. — — DAN SSSR, **100**, 171 (1955).
37. M. D. Hatch, J. F. Turner, Biochem. J., **76**, 556 (1960).
38. H. C. Nielsen, G. Babcoock, F. Sente, Arch. biochem. biophys., **105**, 151 (1964).
39. J. H. Woychik, F. Huebner, R. J. Dimler, Arch. biochem. biophys., **96**, 252 (1962).
40. A. C. Beckwith, J. S. Wall, R. J. Dimler, Fed. Proc., **22**, 348 (1963).
41. D.R. Briggs, W. J. Wolf, Arch. biochem. biophys., **72**, 127 (1957).
42. D. R. Grant, J. M. Lawrence, Arch. biochem. biophys., **108**, 552 (1964).
43. I. A. Weintraub, Iu. Ia. Hofman, Biohimiia, **26**, 13 (1961).
44. N. A. Rodionova, DAN SSSR, **154**, 158 (1957).
45. J. W. H. Lügg, Adv. Prot. Chem., **5**, 271 (1949).
46. R. R. Porter, Brit. Med. Bull., **19**, 197 (1963).
47. A. Ia. Kulberg, I. A. Tarhanova, Biohimiia, **29**, 246 (1964).
48. N. A. Kudriasova, Tr. Glavn. Bot. Sada, **7**, 93 (1960).
49. A. V. Blagowestschenski, R. M. Melamed, Biochem. Z., **273**, 435 (1934).
50. R. Soedigdo, M. Gruber, Biochim. biophys. acta, **44**, 315 (1960).
51. J. Labavie, S. Pfeffer, Rev. Canad. biol., **5**, 233 (1946).
52. V. Gheție, L. Buzilă, St. cerc. biochim., **6**, 49 (1963).
53. N. C. Gopalachari, Ind. J. exp. Biol., **1**, 98 (1963).
54. A. Marcus, J. Feeley, Biochim. biophys. acta, **89**, 170 (1964).
55. J. H. Cherry, Plant physiol., 38, 440 (1963).
56. A. Marcus, J. Velasco, J. biol. Chem., **235**, 563 (1960).
57. J. L. Young, J. E. Varner, Arch. biochem. biophys., **84**, 71 (1959).
58. J. L. Young, R. C. Huang, S. Vanecko, J. D. Marks, J. E. Varner, Plant Physiol., **35**, 288 (1960).
59. G. C. Webster, J. biol. Chem., **229**, 535 (1957).
60. — Arch. biochem. biophys., **85**, 159 (1959).
61. J. T. Lett, W. N. Takahashi, Arch. biochem. biophys., **96**, 569 (1962).
62. A. Markus, J. Feeley, J. biol. Chem., **240**, 1675 (1965).
63. Z. Šormova, F. Šorm, Coll. Czech. Chem. Commun., **21**, 1403 (1966).
64. Oota Yukito, Takata Kenzo, Physiol. Plant., **12**, 518 (1959).
65. L. Ledoux, P. Galand, R. Huart, Biochim. biophys. acta, **55**, 97 (1962).
66. J. Ingle, Plant. Physiol., **37**, suppl. *22* (1962).
67. L. Vovan, C. Dumazert, J. Gregoire, C.R. Soc. Biol., **156**, 708 (1962).
68. Oota Yukito, Ann. Rev. Plant. Physiol., **15**, 17 (1964).
69. Oota Yukito, Takata Kenzo, *Recent Advances in Botany*, Univ. Toronto Ress., Toronto, 1961, p. 1059.

70. L. LEDOUX, P. GALAND, R. HUART, Arch. internat. physiol. biochim., **68**, 839 (1960).
71. L. LEDOUX, R. HUART, Arch. internat. physiol. biochim., **69**, 7 (1961).
72. — — Biochim. biophys. acta, **61**, 185 (1962).
73. L. LEDOUX, P. GALAND, R. HUART, Rad. Bot., **2**, 119 (1962).
74. L. LEDOUX, în *Biological effects of ionizing radiation at the molecular level*, Internat. Atomic Energy Agency, Viena, 1962.
75. L. LEDOUX, R. HUART, Arch. internat. physiol. biochim., **69**, 598, (1961).
76. L. LEDOUX, P. GALAND, R. HUART, Exp. Cell Research, **27**, 132 (1962).

ST. CERC. BIOCHIM., 9, 1, 107–115 (1966)

MODIFICĂRI ENZIMATICE SUB ACȚIUNEA TUBERCULOSTATICELOR

EUG. PĂUNESCU

Ca și în cazul celorlalte chimioterapice, tuberculostaticele își exercită acțiunea la nivelul diferitelor sisteme enzimatice celulare, realizînd adeseori blocarea lanțului de procese metabolice prin inhibarea uneia dintre verigile enzimatice ale acestuia.

Majoritatea enzimelor sînt formate din două părți distincte : o parte proteică și un grup prostetic (ion metalic, vitamină etc.). Alte enzime (în special dintre cele proteolitice) sînt constituite numai dintr-o macromoleculă proteică.

În partea proteică a enzimei, aminoacizii constituenți sînt uniți prin punți peptidice între grupările carboxilice și cele aminice. În felul acesta, din fiecare moleculă de aminoacid rămîn libere fie grupări disociabile reactive (carboxilice, aminice, sulfhidrilice etc.), fie resturi inerte (lanțuri alifatice, inele policiclice etc.). Grupările reactive mijlocesc fixarea pe macromolecula proteică a substratului și a grupului prostetic. Grupările inerte creează anumite distanțări spațiale de-a lungul polimerului polipeptidic, realizînd un aspect caracteristic de torsiune a macromoleculei ; totodată, ele contribuie la stabilirea interrelațiilor cu alte molecule cu care proteina vine în contact.

Blocarea grupărilor reactive ale părții proteice dintr-un sistem enzimatic duce la inactivarea biologică a complexului. Adeseori este suficient ca o singură grupare reactivă să fie blocată pentru a se provoca inactivarea sistemului enzimatic. Astfel, spre exemplu, moleculele amilazei conțin grupări libere aminice, fenolice, amidice, alifatice, tiometilice, imidazolice etc. În cazul amilazei pancreatice, blocarea grupărilor sulfhidrilice și a celor disulfidice nu afectează reactivitatea specifică ; în schimb blocarea grupărilor aminice libere duce la tulburarea activității enzimatice. În cazul β-amilazei orzului, blocarea grupărilor aminice este lipsită de efect, în timp ce blocarea grupărilor fenolice și sulfhidrilice oprește reactivitatea enzimei.

Asemenea procese de blocare a grupărilor enzimatice reactive se presupune că stau la baza mecanismului de acțiune al unor substanțe dezinfectante și chimioterapice.

Mecanismele de *blocare a grupărilor sulfhidrilice* au fost studiate mai în detaliu. Blocarea acestor grupări poate avea loc fie prin oxidare :

$$\equiv C-SH \xrightarrow{-H} \equiv C-S-S-C \equiv$$

fie prin substituirea hidrogenului cu alte grupări (A) :

$$\equiv C-SH + A-OH \rightarrow \equiv C-SA + H_2O$$

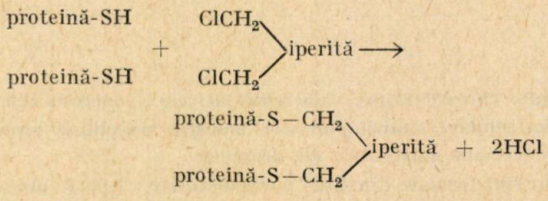
Este de asemenea posibilă blocarea prin descompunere pe cale metabolică, condensare, sinteză etc. În cele mai numeroase cazuri însă, agenții chimici reacționează cu grupările sulfhidrilice ale enzimelor prin formarea de complecși.

Dintre sistemele enzimatice care sînt inactivate prin blocarea grupărilor sulfhidrilice trebuie citate în primul rînd apoenzimele dehidrogenazelor succinică, alcoolică și fosfogliceraldehidică, precum și coenzimele de tipul acidului lipoic (la care fiecare moleculă deține două tiogrupări direct reactive) și coenzima A. Toate acestea dețin un important rol în metabolismul intermediar, și în special în metabolismul glucidic.

O serie de substanțe care conțin grupări metilenice fixate de carbonul carboxilic — cum sînt acidul penicilic, iodoacetatul și unele aldehide și cetone — pot de asemenea bloca tiogrupările reactive enzimatice :

$$\text{proteină-SH} + \text{A.CH}_2\text{.COOH} \rightarrow \text{proteină-S-CH}_2\cdot\text{COOH} + \text{AH}$$

O acțiune similară au „gazele de mușt ar" :



În afară de grupările sulfhidrilice, unii agenți chimici pot bloca selectiv alte grupări reactive enzimatice. Astfel, agenții oxidanți pot acționa asupra aminogrupelor libere ale polipeptidelor (cum sînt grupările ε-aminice ale resturilor de lizină).

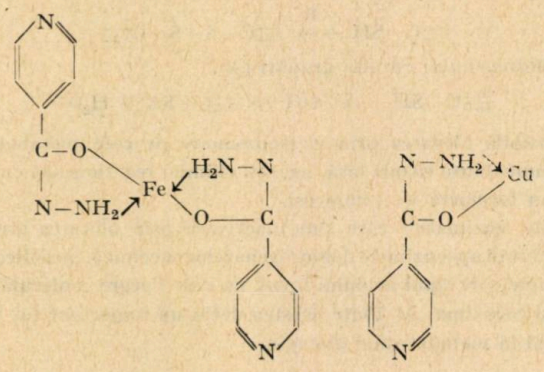
Posibilitățile de blocare a unor grupări active din structurile proteice enzimatice sînt dirijate și de condițiile de mediu. În acest sens, este cunoscută capacitatea formaldehidei de a reacționa diferențiat, în funcție de reacția mediului ambiant ; astfel : la pH alcalin (9,5) formaldehida blochează grupările aminice libere, la pH 6 ea acționează asupra ciclului imidazolic al histidinei, iar la un pH mai acid (sub 5) formaldehida se fixează în special pe grupările aminice și guanidilice.

În ceea ce privește acțiunea substanțelor medicamentoase asupra grupărilor prostetice enzimatice, se cunosc în prezent două modalități majore : a) reacția directă cu gruparea prostetică și b) acțiunea competitivă cu aceasta.

Un exemplu tipic de inhibiție a activității enzimatice ca urmare a *reacției directe* a agentului chimic cu gruparea prostetică îl constituie interacțiunea enzimelor metalice (ferice, cuprice) cu cianurile, oxidul de carbon, hidroxilamina, azide diferite și compușii ditionați, ca de pildă *2,3*-dimercaptopropanolul (B.A.L.).

Ionul de fluor poate reacționa cu cofermentul enolazei (ionul de magneziu), rezultînd un complex magneziu-fluorofosfat. Rezultatul acestei reacții este acumularea de acid fosfoglicеric în cursul glicolizei anaerobe.

Hidrazida acidului izonicotinic (HIN) — tuberculostatic major cu acțiune terapeutică deosebit de eficace [1] — are capacitatea de a forma cu ionii metalelor grele (Cu, Fe) complecși chelatici, de tip special :



Un complex similar, de tip chelatic, este probabil că se realizează și în cazul reacției dintre HIN și vanadat [2], reacție care stă la baza „testului cu vanadat", descris de Păunescu și Buzescu [3], [4] pentru punerea în evidență în produsele biologice a hidrazidei libere, activă tuberculostatic.

Capacitatea chelatantă a HIN față de ionii metalelor grele a fost corelată de mai mulți autori [5—8] cu procesul de pierdere a activităților catalazică și peroxidazică la bacilii deveniți HIN-rezistenți, trăgîndu-se concluzia că HIN inhibă activitatea acestor enzime prin blocarea coenzimei lor (ionul de fier). Cercetările detaliate ale lui Andrejew și Tacquet [8] au arătat că la b. tbc. HIN inhibă formarea catalazei și a peroxidazei și că, de asemenea, HIN inhibă direct și în mod necompetitiv activitatea enzimelor care distrug peroxidul de hidrogen, izolate și purificate din cortexul renal de oaie și din hrean. HIN nu inhibă însă în mod direct activitatea catalazică a unei suspensii de micobacterii și, de asemenea, este lipsită de acțiune asupra tulpinilor catalazopozitive și HIN-rezistente, cum sînt cele de paratuberculoși [9]. Or, este cunoscut [1], [10] că HIN are acțiune chimioterapică electivă manifestă strict asupra micobacteriilor mamiferelor (variantele umană și bovină), la care nu se poate pune în evidență inhibiția directă a catalazei și peroxidazei în prezența HIN, dar care — cultivate în medii cu HIN — dau mutante HIN-rezistente, lipsite de enzimele ce pot disocia peroxidul de hidrogen. Aceste date sugerează că HIN acționează mai puțin asupra activității peroxidazice și catalazice, și mai curînd prin inhibarea procesului de sinteză a sistemelor enzimatice catalazic și peroxidazic.

În același sens pledează și studiile privind acțiunea HIN asupra altor enzime ferice, ca sistemul citocromic și citocromoxidaza. Astfel, Andrejew, Gernez-Rieux și Tacquet [11] au constatat că HIN nu are acțiune asupra sistemelor citocromilor *a*, *b* și *c*. În ceea ce privește citocromoxidaza, Soru, Istrati și Paraschivescu [12] arată că, spre deosebire de streptomicină și de acidul *p*-aminobenzoic, HIN provoacă o anumită dereglare a activității acestei enzime ferice, însă procesul are o intensitate incomparabil mai redusă decît cel de inhibare a sintezei catalazei și peroxidazei.

Concluzia acestor studii este că, prin procese de chelație, HIN are capacitatea potențială de a bloca activitatea unor metal-enzime, dar că — *in situ* — această acțiune nu este manifestă.

Alte studii au avut drept scop cercetarea interacțiunii HIN-enzime sub aspect competitiv față de gruparea prostetică.

Acțiunea competitivă a agentului fizic față de gruparea prostetică a enzimelor are loc atunci cînd între coenzimă și factorul inhibitor există o anumită asemănare structurală. Astfel, spre exemplu, fosfatul de piridoxal, coenzimă a decarboxilazei, poate fi substituit competitiv de dezoxipiridoxal-fosfat, rezultînd inactivarea fermentului. Carboxilaza, în prezența tiazol-pirofosfatului, suferă de asemenea o inactivare, datorită substituirii coenzimei (tiazolfosfat-pirimidina).

Un exemplu clasic de concurență între coenzimă și chimioterapic îl constituie acțiunea competitivă a derivaților acidului *p*-aminosulfonic (sulfonamide) față de acidul *p*-aminobenzoic (vitamina H' a bacteriilor) [13].

Dintre tuberculostatice, un mod de acțiune similar cu cel al sulfonamidelor îl prezintă acidul *p*-aminosalicilic (PAS), a cărui acțiune se manifestă prin antagonizarea acidului *p*-aminobenzoic (PAB sau vitamina H'). La nivelul celulei bacteriene, molecula de PAS se combină cu o reductonă (trioză) intracelulară, blocînd-o și lipsind astfel PAB de posibilitatea de a forma complexul PAB-reductonă. Acest compus intermediar este indispensabil pentru biosinteza acizilor pteroici și a coenzimelor pteroice (acizii folici etc.). Inhibarea procesului de formare a complexului PAB-reductonă are drept rezultat blocarea sintezei acizilor nucleici și, consecutiv, blocarea diviziunii celulei bacteriene (bacteriostază).

Un alt tuberculostatic — FR-7, derivat fenolat al PAS-ului (*para*-aminosalicilatul de fenil) — prezintă *in vitro* o putere tuberculostatică de 10—16 ori mai mare decît a PAS-ului, deoarece sînt necesare cantităţi molare de PAB de 20 de ori mai mari pentru inactivarea FR-7 decît pentru inactivarea PAS-ului. În final însă, preparatul FR-7 acţionează prin liberare de PAS, mecanismul său de acţiune reducîndu-se de asemenea la concurenţa cu vitamina H' (PAB) pentru formarea complexului cu reductona intracelulară, precursoare a coenzimelor pteroice.

Pentru HIN, datorită faptului că — în cursul metabolizării acesteia — are loc formare de acid izonicotinic, Krüger-Thiemer [14] a sugerat ca mod de acţiune competiţia dintre acidul izonicotinic rezultat din catabolizarea HIN şi acidul nicotinic, component al coenzimei I (DPN). În acelaşi sens lucrările lui Kerpolla şi Patiala [15], care au constatat o scădere a piridin-nucleotidelor în sîngele animalelor infectate cu tuberculoză şi o revenire la normal a concentraţiei acestor substanţe în urma administrării HIN, sugerează posibilitatea ca HIN să acţioneze prin inhibarea reacţiilor enzimatice în care sînt interesate piridin-nucleotidele. Cercetările întreprinse în Institutul de ftiziologie din Bucureşti [16—19] în legătură cu competiţia dintre HIN şi DPN au arătat însă că adăugarea de DPN în mediul de reacţie nu poate neutraliza inhibiţia prin HIN a oxidării unor metaboliţi ai ciclului Krebs (piruvat, malat, fumarat, succinat şi lactat), al căror catabolism în absenţa HIN este stimulat de DPN.

În acelaşi sens, cercetările întreprinse de Nasta şi colaboratori [20] privind influenţa HIN asupra metabolismului acetatului la genul *Mycobacterium*, precum şi cercetările lui Păunescu [17] asupra decarboxilării piruvatului la *Mycobacterium tuberculosis*, au arătat că între HIN şi DPN nu există o competiţie directă : prezenţa HIN activează atît α-cetocarboxilaza (calea anaerobă), cît şi dehidrogenaza piruvică (calea oxidativă). Această acţiune a tuberculostaticului poate fi pusă, probabil, pe seama interacţiunii dintre HIN şi α-cetoacizi, proces semnalat încă din 1957 de către Nasta şi Păunescu [21] : în prezenţa HIN, acidul piruvic dă o bază Schiff care, după prealabila transpoziţie a dublei legături, liberează aminoacidul corespunzător (alanina) şi acidul izonicotinoil-hidroxamic.

Interacţiunea HIN cu α-cetoacizii, şi în special cu acidul piruvic, stă la baza unui complex de procese fiziopatologice care afectează nu numai celula bacteriană, ci şi macroorganismul-gazdă. În acest din urmă caz este vorba de aşa-numitele „efecte secundare" ale tratamentului cu HIN, printre care tulburările neurologice (crize epileptiforme, polinevrite senzitivo-motorii etc.) ocupă un loc principal. Apariţia lor este legată de disfuncţiile de ordin glucidic, localizate mai ales la nivelul metabolismului acidului piruvic. Este probabil ca înseşi structurile morfologice — aşa-numitul „caracter accentuat reticular" al procesului de organizare şi vindecare sub HIN-terapie descris de Eskenasy [22] — să reflecte aceleaşi modificări funcţionale metabolice induse de prezenţa HIN.

Cercetările întreprinse în legătură cu mecanismul efectelor secundare ale HIN au indicat posibilitatea ca HIN să acţioneze ca o antivitamină B_6 [23], [24], din competiţia dintre HIN şi piridoxină, rezultînd inhibiţia unui număr mai mare de procese enzimatice [25], şi anume :

— transaminarea acizilor oxalacetic, piruvic şi cetoglutaric ;
— sinteza inelului nicotinic pe seama 3-hidroxikinureninei ;
— formarea acidului γ-aminobutiric pe seama acidului glutamic ;
— condensarea serinei şi indolului cu formare de triptofan etc.

★

Un alt tuberculostatic cu calităţi competitive faţă de coenzimele bacteriene este *streptomicina*, care s-a dovedit a interfera cu metabolismul monoribonucleotidelor [1], [10]. Cercetările mai detaliate ale lui Umbreit, ca şi ale lui de Wyss şi colaboratori [26] au arătat însă că

efectul competitiv privind catabolismul monoribonucleotidelor este secundar unor procese de blocaj la nivelul schimburilor energetice, și anume : streptomicina blochează procesele de oxidare în stadiul de acetat, veriga enzimatică sensibilă fiind aceea care asigură degradarea piruvatului în acetat. În acest sens, cercetările întreprinse de Păunescu [17] la *Mycobacterium tuberculosis* au arătat că atît streptomicina, cît și penicilina (în concentrații mari) inhibă procesul global de decarboxilare a piruvatului în acetat, inhibiția putînd fi datorită reducerii permeabilității membranei celulare. De altfel, în cercetări ulterioare [27], Păunescu și colaboratori au constatat că *penicilina* (în concentrații de peste 100 u. Oxford/ml) inhibă procesele de biosinteză a peretelui celular al micobacteriilor, prin blocarea utilizării acidului diaminopimelic.

În cazul micobacteriilor, acțiunea streptomicinei pare să aibă loc cu precădere la nivelul proceselor oxidative [1], [10]. Astfel, la *Mycobacterium smegmatis*, sensibil la streptomicină, prezența antibioticului inhibă activitatea diamino-oxidazei, în timp ce, aceeași enzimă, dacă provine de la variantele streptomicinorezistente nu este inhibată de tuberculostatic. La *Mycobacterium avium*, streptomicina inhibă procesul de oxidare a acizilor grași saturați ce conțin lanțuri carbonice cu peste 12 atomi de carbon ; totodată, s-a constatat că tulpinele streptomicinorezistente prezintă o foarte redusă activitate oxidazică față de acești acizi grași superiori, ceea ce indică o modificare a căii metabolice inițiale de degradare a lipidelor, modificare survenită o dată cu dobîndirea streptomicinorezistenței.

In vivo, o altă acțiune a streptomicinei, evidențiată histochimic de o serie de autori și în mod detaliat de către Eskenasy și Galbenu [32], este stimularea proceselor fibrilosclerogene. Autorii au demonstrat, în acest sens, activarea proceselor biochimice de polimerizare a mucopolizaharidelor neutre din substanța fundamentală, sub acțiunea streptomicinei.

★

În cazul tuberculostaticelor „minore" sau „de releu" (cicloserina, tiosemicarbazona, etionamida, pirazinamida etc.), studiile de laborator întreprinse au arătat de asemenea existența unor interacțiuni între chimioterapic și unele sisteme enzimatice.

Astfel, cicloserina pare să exercite o acțiune competitivă față de coenzimele ce conțin piridoxină sau derivații acesteia (piridoxal-fosfat, piridoxamină). În acest sens, Aoki [28], ca și Kaneo [29], au semnalat, la *Mycobacterium tuberculosis*, inhibarea piridoxal-enzimelor (decarboxilaza glutamică, transaminaza glutamic-aspartică, sinteza derivaților carboxamidei etc.) sub acțiunea cicloserinei.

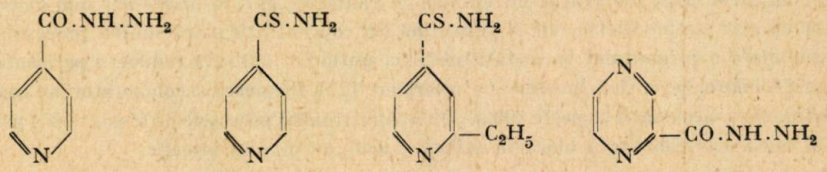
Mizohata [30] a constatat neutralizarea efectului tuberculostatic al cicloserinei prin adăugarea de piridoxină, alanină și ATF la mediul de cultură. De asemenea, studiile lui Vișepan, Ivanova și Cernuki [31] au demonstrat o inactivare totală a transaminazelor glutamică și aspartică sub acțiunea cicloserinei și reactivarea acestor procese enzimatice sub influența piridoxaminei.

★

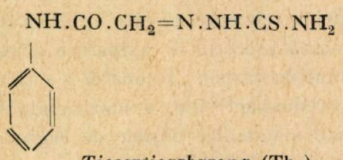
Un aspect interesant al problemei interacțiunii dintre chimioterapice și enzime îl constituie relația dintre structură și acțiune.

În acest sens, în ciuda faptului că între PAS și sulfonamide există o mare similitudine structurală, iar mecanismele de acțiune sînt superpozabile, trebuie subliniat gradul marcat de specificitate al PAS-ului, și anume : în doze terapeutice, PAS-ul este activ în special în cazul micobacteriilor, iar variantele PAS-rezistente ale acestor bacterii nu manifestă rezistență încrucișată cu sulfonamidele.

Un alt caz interesant în ceea ce privește relația dintre structură și acțiune îl constituie HIN și o serie de alte tuberculostatice cu structură chimică similară : etinoamida (trecator sau amidazin), pirazinamida (aldinamida sau piraldina) și tiosemicarbazonele.



HIN *Tioizonicotinamida* *Etionamida* (13.14 *Th*) *Pirazinamida*



Tiosemicarbazona (Tb_1)

Pentru evidențierea eventualelor corelații dintre modul de acțiune a acestor tuberculostatice, colectivul de biochimie și fiziologie bacteriană al Institutului clinic de ftiziologie din București a utilizat metode variate.

1) Astfel, într-o serie de studii s-au cercetat caracterele metabolice [33] și de rezistență încrucișată [35] ale celulelor de micobacterii dezvoltate în prezența acestor chimioterapice, pornindu-se de la faptul cunoscut că bacteriile devenite rezistente la un agent chimioterapic elimină din metabolismul lor acele verigi metabolice care prezintă sensibilitate inițială la tuberculostaticul cu care au fost puse în contact. În felul acesta apare întemeiată concluzia că, dacă o celulă bacteriană la care s-a indus rezistența la un chimioterapic manifestă rezistență și față de alt agent terapeutic, atunci locul de acțiune al celor două chimioterapice este același.

Studiile de acest fel [35], întreprinse cu HIN, etionamidă și tiosemicarbazonă (Tb_1), au arătat că :

a) Dobîndirea rezistenței la Tb_1 sau la etionamidă nu modifică gradul de rezistență a tulpinilor HIN-rezistente. În schimb, HIN-rezistența antrenează o anumită scădere a sensibilității față de Tb_1.

b) Dobîndirea rezistenței la Tb_1 duce la dezvoltarea unei rezistențe concomitente și la etionamidă.

c) De asemenea inducerea rezistenței la etionamidă conduce și la creșterea rezistenței față de Tb_1.

Cu alte cuvinte : etionamida și Tb_1, substanțe ce dețin în poziția terminală a lanțului lateral aceeași grupare $-CS.NH_2$, dau rezistențe încrucișate. Etionamida și HIN, pe de altă parte, cu toate că au același eterociclu de bază (inelul izonicotinic), nu dau rezistențe încrucișate [35].

Rezistența încrucișată denotă deci un mecanism de acțiune comun, lucru de altfel dovedit și prin studiul unor anumite caractere metabolice ale tulpinilor rezistente [33]. Astfel, în timp ce modificările metabolice induse de Tb_1-rezistență sînt similare celor care caracterizează etionamidorezistența, între proprietățile metabolice ale HIN-rezistenței și cele ale etionamidorezistenței nu există corelație [33]. În sfîrșit, la aceeași concluzie — necores-

pondenţa mecanismelor de acţiune la chimioterapicele care nu dau rezistenţă încrucişată — duc şi studiile histologice şi histochimice realizate de Diaconiţă şi colaboratori [36], care constată că între dinamica inflamaţiei tuberculoase sub acţiunea etionamidei şi aceea sub acţiunea HIN există deosebiri multiple, ceea ce concordă cu mecanismele variate de acţiune ale celor două tuberculostatice.

2) Alte studii întreprinse în laboratorul de biochimie şi fiziologie bacteriană al Institutului clinic de ftiziologie din Bucureşti au avut drept scop aprofundarea corelaţiilor dintre structura chimică şi unele caractere biochimice şi biofizice ale acestor tuberculostatice [34]. Aceste studii au arătat că HIN şi etionamida, care posedă un eterociclu azotat comun (inelul izonicotinic), manifestă proprietăţi oxidoreducătoare similare, fiind capabile să reducă în formazan clorura de trifenil-tetrazoliu, proprietate similară cu aceea a coenzimelor pridin-nucleotidice (DPN şi TPN).

Această proprietate poate explica interacţiunea acestor tuberculostatice cu enzimele dehidrogenazice piridin-nucleotidice (aşa cum s-a amintit mai înainte), fără a permite însă considerarea acestui proces drept mecanism de acţiune al efectului tuberculostatic, deoarece — aşa cum s-a menţionat — cele două chimioterapice nu dau rezistenţă încrucişată.

★

În încheiere, trebuie reamintit că — la fel cu celelalte chimioterapice — tuberculostaticele manifestă capacităţi multiple şi variate de interacţiune cu sistemele enzimatice celulare. Acestea constau fie în reacţia directă cu partea proteică a enzimelor sau cu procesele de sinteză a acestor molecule proteice, fie în interacţiunea diferenţiată dintre tuberculostatic şi coenzimă : blocare prin reacţie chimică directă sau prin substituţie competitivă. Trebuie de asemenea subliniată afinitatea selectivă a tuberculostaticelor faţă de celula bacilară, pe care se fixează în mod preferenţial. Iar în ceea ce priveşte mecanismul de acţiune al acestor chimioterapice, trebuie reliefat că efectul tuberculostatic este rezultatul fie al unor procese complexe de interacţiune cu multiple verigi metabolice, fie al interacţiunii cu un singur sistem enzimatic, vital pentru economia metabolică a celulei bacteriene supuse acţiunii chimioterapicului respectiv.

Prezentată la redacţie
la 27 octombrie 1965

Laboratorul de biochimie şi fiziologie bacteriană al Institutului clinic de ftiziologie, Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. M. Nasta, G. Algeorge, Eug. Păunescu, *Bazele experimentale ale chimioterapiei tuberculozei*, Probleme de tuberculoză, Edit. Acad. R.P.R., 1962, vol. III, p. 15—37.
2. Eug. Păunescu, *Identificarea derivaţilor metabolici ai hidrazidei acidului izonicotinic*, St. cerc. biochimie, **4**, *1*, 117—122 (1961).
3. Eug. Păunescu, M. Buzescu, *Test pentru controlul tratamentului ambulator cu hidrazidă*, Ftiziologia, *6*, 547—549 (1960).
4. Eug. Păunescu, M. Buzescu, *Aprecierea hidrazidemiei active cu ajutorul unui test urinar de decelare a HIN*, St. cerc. med. int., **1**, *6*, 701—709 (1960).
5. M. L. Cohn, U. Oda, G. Middlebrook, *Studies on isoniazid and tubercle bacilli. I. The isolation of isoniazid-resitant mutants in vitro*, Am. Rev. Tuberc., **70**, *3*, 465—475 (1954).
6. A. Andrejew, Ch. Gernez-Rieux, A. Tacquet, *L'activité peroxydasique des Mycobactéries*, Ann. Inst. Pasteur, **91**, 586—589 (1956).
7. M. O. Tirunarayanan, W. A. Vischer, H. Bruhin, *Some properties of catechol peroxidase of Mycobacteria bearing of isoniazid susceptibility*, J. Bact., **80**, *4*, 423—429 (1960).

8. A. Andrejew, A. Tacquet, *Métabolisme des Mycobactéries sensibles et résistances à l'INH. Activité amino-acide oxydasique (production d'eau oxygénée)*, Ann. Inst. Pasteur, **93**, 695—704 (1958).

9. M. Nasta, Eug. Păunescu, P. Georgescu, *Modificări metabolice şi de compoziţie chimică ce însoţesc hidrazido-rezistenţa la Mycobacterium tuberculosis*, Probl. de tuberculoză, Edit. Acad. R.P.R., 1960, vol. I, p. 75—108.

10. L. Mesrobeanu, Eug. Păunescu, *Fiziologhiia bakterii*, Edit. Meridiane, Bucureşti, 1963.

11. A. Andrejew, Ch. Gernez-Rieux, A. Tacquet, *Action de l'INH et de la D-cycloserine sur la peroxydase purifiée et sur l'activité peroxydasique du bacille tuberculeux*, Ann. Inst. Pasteur, **96**, 145 (1959).

12. E. Soru, M. Ciucă, *Aspectul enzimologic al chimiorezistenţei bacilului tuberculozei*, Probl. de tuberculoză, Edit. Acad. R.P.R., 1962, vol. III, p. 227—248.

13. D. D. Woods, Brit. J. exp. Path., **21**, 74 (1940).

14. E. Krüger-Thiemer, Am. Rev. Tuberc., **77**, 364 (1958).

15. W. Kerppola, J. Patiala, *Piridinnucleotides (coenzymes I and II) of blood in normal subjects and in various diseases, especially tuberculosis*, Ann. med. exp. biol. fenn. Helsinki), **27**, 7 (1954).

16. M. Nasta, Eug. Păunescu, P. Georgescu, *Efectul combinat al coenzimei I şi hidrazidei asupra catabolismului oxidativ terminal la genul Mycobacterium*, St. cerc. biochim., **1**., *4*, 313—320 (1958).

17. Eug. Păunescu, *Decarboxilarea piruvatului la Mycobacterium tuberculosis*, St. cerc. biochim., **2**, *3*, 299—307 (1959).

18. M. Nasta, Eug. Păunescu, P. Georgescu, *Recherches sur les modifications de la constitution chimique et du métabolisme des Mycobactéries, virulentes à divers degrés*, Rev. sci. méd. **5**., *1—2*, 75—78 (1960).

19. M. Nasta, Eug. Păunescu, *Influenţa hidrazidei acidului izonicotinic asupra ciclului acizilor tricarboxilici la micobacterii*, St. cerc. inframicrobiol., microbiol., parazitol., **9**, *4*, 471—479 (1958).

20. M. Nasta, Eug. Păunescu, P. Georgescu, *Metabolismul acetatului la genul Mycobacterium şi influenţa hidrazidei acidului izonicotinic*, Probl. de terapeutică, Edit. Acad. R.P.R., **10**, *1*, 19—26 (1959).

21. M. Nasta, Eug. Păunescu, *În legătură cu modul de acţiune al hidrazidei acidului izonicotinic. Interacţiunea hidrazidei cu α-cetoacizii*, Probl. de terapeutică, Edit. Acad. R.P.R., **8**, 51—60 (1957).

22. Al. Eskenasy, *Morfogeneza proceselor de organizare şi vindecare a leziunilor tuberculoase din ganglionii limfatici sub influenţa tratamentului cu tuberculostatice*, Probl. de tuberculoză, Edit. Acad. R.P.R., 1961, vol. II, p. 145—170.

23. J. Biehl, R. W. Vilter, *Effect of isoniazid on vitamin B_6 metabolism*, Proc. Soc. exp. Biol., **85**, 289 (1954).

24. J. Biehl, R. W. Vilter, *Effects of isoniazid on pyridoxine metabolism*, J. Amer. med. Assoc., **156**, 1549 (1954).

25. P. Georgescu, *Substratul biochimic al efectelor secundare produse de hidrazida acidului izonicotinic*, Ftiziologia, **14**, *2*, 105—114 (1965).

26. O. Wyss, G. N. Smith, G. L. Hobby, E. L. Oginsky, R. Pratt, *Symposium on the mode of action of antibiotics*, Bacteriol. Rev., **7**, 17 (1963).

27. Eug. Păunescu, A. Ciolac-Negoescu, Gh. Pisică, *Influenţa tween 80 şi a penicilinei asupra proprietăţilor fizico-chimice ale peretelui celular la micobacterii*, St. cerc. biochim., **7**, *1*, 83 (1964).

28. T. Aoki, *Cycloserine and pyridoxal phosphat*, Kekkaku, **32**, 403 (1957).

29. I. Kaneo, M. G. Sevag, *Pyridoxal-enzymes inhibition by cycloserine*, Antibiotics a. chemotherapy, **3**, 63 (1956).

30. H. Mizohata, *In vitro neutralisation of tuberculostatic effect of cycloserine*, Kekkaku, **33**, 274 şi 372 (1958).

31. E. D. Visepan, K. I. Ivanova, A. M. Cernuki, *Ţikloserin i aminokislot*, Biul. eksp. biol. med., **47**, *8*, 52 (1959).

32. Al. Eskenasy, P. Galbenu, *Determinismul streptomicinic al sclerozelor extrafocale din plămînul tuberculos*, Ftiziologia, **14**, *1*, 21 (1965).

33. Eug. Păunescu, G. Algeorge, Al. Eskenasy, A. Ciolac, Gh. Pisică, *Tipuri metabolice „de virulență" și „de chimiorezistență", la micobacterii*, Probleme de tuberculoză, vol. IV, Edit. medicală, București, 1964, p. 141.

34. Eug. Păunescu, *Corelații între structura chimică, potențialul oxidoreducător și activitatea tuberculostatică a unor chimioterapice*, St. cerc. biochim., **5**, *4*, 587 (1962).

35. Eug. Păunescu, G. Algeorge, *Rezistența relativă la tiosemicarbazonă și la etionamidă a bacilului tuberculozei sensibil și rezistent la hidrazida acidului izonicotinic*, Ftiziologia, **3**, 245 (1962).

36. Gh. Diaconiță, Al. Eskenasy, E. Stoica, *Dinamica inflamației tuberculoase experimentale sub acțiunea etionamidei*, Probleme de tuberculoză, vol. V, Edit. medicală, București, 1964, p. 99.

EUGENE D. DAY, *The Immunochemistry of Cancer* (Imunochimia cancerului), Edit. Charles C. Thomas, Springfield, Illinois, 1965, XV + 170 p., cu 5 fig. și 53 de tabele.

Prin apariția cărții *The Immunochemistry of Cancer* scrisă de E. D. Day, profesor de imunologie la universitatea Duke, Durham, S.U.A., literatura imunochimică s-a îmbogățit cu încă o lucrare valoroasă. Acest studiu completează puținele publicații consacrate imunologiei cancerului, printre care lucrarea documentată *Virusologhia i immunologhia raka*, de L. A. Zilber și G. I. Abelev (Medghiz, Moscova, 1962), marchează un început.

Dedicată în exclusivitate aspectului imunochimic al fenomenelor canceroase, opera lui E. Day se prezintă sub forma unei monografii în care cercetările majore sînt alese cu competența specialistului. Studierea cărții îl conduce pe cititor spre formarea unei imagini complete despre eforturile întreprinse în întreaga lume pentru cunoașterea și combaterea acestei boli. Totodată, lucrarea elaborată de E. Day pune la îndemîna cercetătorilor consacrați acestei probleme mijloace și idei noi, îndeosebi prin metoda de expunere originală a autorului, care constă în reliefarea printr-o analiză critică a concluziilor care rezultă din fiecare aspect cercetat al imunochimiei cancerului.

Lucrarea este împărțită în patru părți, consacrate următoarelor probleme :

I. Cercetarea specificității serologice ;

II. Transformările antigenice ca expresie a malignității ;

III. Modelul imunochimic al factorilor terapeutici și de diagnostic anticanceroși ;

IV. Apendice.

Fiecare parte cuprinde un număr de capitole în care se descriu cele mai importante contribuții la cercetarea problemei respective.

Astfel, în prima parte a monografiei se tratează lucrările referitoare la descoperirea antigenelor specifice cancerului. Autorul amintește descoperirea lui E. Witebsky (1929) privind existența unui sistem lipidic care apare în cancerul uman, serologic distinct de lipidele țesutului normal și de substanțele sanguine alcoolosolubile, insistînd totodată și asupra confirmărilor ulterioare aduse acestei descoperiri.

Un alt capitol al primei părți este consacrat izolării și caracterizării unor proteine speciale care apar în cancer. Aceste proteine au un grad de complexitate și instabilitate mult mai mare decît lipidele specifice cancerului și, din această cauză, cercetarea lor necesită o deosebită atenție, mai ales în ceea ce privește depistarea prezenței lor. Se citează ca realizări deosebite lucrările lui L. A. Zilber și colaboratori (1962) privind analiza antigenică a cancerului gastric uman. Deocamdată, antigenele specifice cancerului gastric nu s-au putut obține în stare pură, și numai după ce ele vor fi perfect purificate se va putea trage concluzia dacă aceste antigene sînt cantitativ sau calitativ specifice pentru țesutul canceros.

Unul dintre cele mai semnificative studii în dezvoltarea tehnicilor imunochimice necesare izolării și caracterizării proteinelor specifice în cancer a fost realizat de G. I. Abelev și V. A.

Tvetkov (1960), care au elaborat metoda imunofiltrării. Prin această tehnică, antigenele nedorite care migrează electroforetic sînt precipitate sau încetinite în mişcare de anticorpi specifici, în timp ce antigenele urmărite îşi continuă neîntrerupt mişcarea lor. Întîlnirea anticorpilor specifici pentru impurităţi (stabiliţi prin încercări prealabile) cu antigenele impurificatoare se realizează cu ajutorul curentului de electroosmoză. Prin repetarea fenomenului, antigenul urmărit se debarasează de impurităţile care-l însoţesc, precum şi de proteinele serului imun folosit la purificare. Se realizează astfel un „filtru" de anticorpi care lasă să treacă numai acele componente care n-au reacţionat cu anticorpii. Folosind această tehnică, autorii citaţi au purificat antigenul specific al hepatomului transplantabil al şoarecilor şi l-au caracterizat ca aparţinînd grupului alfa-globulinic.

În capitolul următor, E. Day îşi expune cercetările proprii referitoare la rolul fibrinei în tumorile transplantabile. După autor, apariţia şi depunerea fibrinei în tumoare se produce în două faze, una care coincide cu reacţia inflamatorie în ţesutul inoculat, a doua fiind faza măririi masei tumorale însăşi. Rezultă din aceste cercetări că tumorile transplantabile sînt bogate în fibrină şi că antiserurile preparate faţă de ele cuprind o mare cantitate de anticorpi faţă de fibrină.

Pe de altă parte, E. Day şi colaboratori (1959) au constatat că anticorpii faţă de fibrină, pătrunzînd în sînge şi combinîndu-se cu fibrinogenul, nu-şi pierd proprietatea de a se localiza în tumoare *in vivo*, cu toate că îşi pierd această proprietate în cazul experienţelor de adsorbţie *in vitro*. Pentru a explica această contradicţie, autorii au presupus că fibrinogenul ar constitui un conductor specific al anticorpilor respectivi în tumoare. Anticorpii, pătrunzînd în sînge, se combină cu fibrinogenul care se depune în tumoare sub forma de fibrină şi antrenează cu el anticorpii.

Controversatele lucrări efectuate de Björklund şi colaboratori între anii 1957 şi 1961 ocupă de asemenea un loc în monografia lui E. Day, autorul socotindu-le ca avînd un rol pozitiv în încercările moderne de înţelegere a aspectului imunochimic al cancerului. Astfel, B. Björklund şi V. Björklund (1957) au identificat şi au studiat sub aspect imunologic şi chimic un antigen prezent în carcinoamele umane cu cele mai diverse localizări. Metoda întrebuinţată a fost cea a testului citotoxic.

Partea întîi a cărţii se încheie cu o recapitulare asupra datelor cunoscute în prezent despre antigenele specifice cancerului. Această sinteză a celor mai bune şi mai interesante lucrări din imunologia cancerului permite cititorului să-şi facă o idee completă asupra acestei probleme.

Transformările antigenice care apar în urma instalării fenomenelor maligne formează obiectul celei de-a doua părţi a cărţii. Se tratează în special aspectele semnalate de E. Weiler (1952) asupra fenomenelor de ştergere a antigenicităţii ţesutului normal în timpul transformărilor maligne. Lucrări mai recente confirmă ipoteza lui Weiler. Dintre acestea, autorul aminteşte lucrarea lui J. Leighton (1964) privind teoria echilibrului interclonal ca regulator fiziologic al creşterii tumorilor, precum şi lucrările conduse de V. R. Potter (1962) referitoare la un aspect biochimic în carcinogeneza hepatomului Morris, şi anume, simpla încetare a acţiunii enzimelor catabolice poate fi precedată de ştergeri care se manifestă printr-o stimulare a enzimelor asociate cu sinteza ADN-ului şi cu diviziunea celulară, apărînd în acest fel celule canceroase.

Pe baza acestor fapte şi ipoteze, E. Day construieşte o ipoteză a ştergerii antigenicităţii în cancer, care cuprinde următoarele idei mai importante :

a) factorul carcinogen se combină cu substanţele tisulare, formînd complexe antigenice ;

b) multe dintre aceste complexe antigenice se şterg în procesele imune sau catabolice ;

c) ştergerile antigenice cele mai obişnuite, ca urmare a transformărilor maligne, au loc datorită modificărilor enzimatice care stimulează sinteza ADN-ului şi diviziunea celulară ;

d) se produc astfel celule canceroase cu un profil antigenic nou ;

e) celulele canceroase au trei căi de dezvoltare, şi anume : pot muri, rezistă şi îşi menţin noul profil antigenic sau îşi pot pierde profilul antigenic specific, devin anaplastice şi continuă să crească ;

f) într-o familie de celule tumorale care determină o creştere înceată a tumorii sînt prezente două tipuri de celule, unele diferenţiate şi antigenic distincte, altele anaplastice şi lipsite de antigenicitate ;

g) eliminarea primului tip de celule are ca urmare o anaplazie spontană şi o malignitate crescută.

Diversitatea şi reversibilitatea antigenică este prezentată în monografie explicit, dar incomplet faţă de materialele publicate în legătură cu acest subiect.

Secreţia antigenelor specifice în lichidele şi umorile organismului canceros este de asemenea tratată mai succint în monografie. Se amintesc lucrările lui G. I. Abelev şi V. A. Ţvetkov (1960), privind o alfaglobulină secretată de celulele hepatomului în serul organismului-gazdă, ale lui F. H. Wuhrmann şi colaboratori (1950), care au descris secreţia unei globuline anormale în plasmocitom, cunoscută azi ca gamma-1A-globulina şi care se găseşte şi în serul normal. Sînt amintite apoi lucrările lui G. J. Thorbecke şi colaboratori (1962) privind secreţia celulelor tumorale la şoareci, ale lui B. A. Askonas şi J. L. Fahey (1961) care arată că celulele plasmatice provenite din tumorile cancerului murin la şoareci pot sintetiza *in vitro* proteine de tipul Bence-Jones şi al celor prezente în mielom. Toate aceste lucrări sînt critic analizate de autor, recomandîndu-se cercetătorilor să fie deosebit de circumspecţi în diferenţierea unui profil antigenic normal de unul specific canceros.

Catabolismul antigenelor specifice în cancer este urmărit de asemenea în monografie, relatîndu-se modificările ce apar în serurile pacienţilor canceroşi şi metodele de detectare a lor.

Dintre metodele de diagnosticare imunologică, se discută testul Schultz-Dale în modificările realizate de D. Burrows (1962) şi de J. C. Makari (1962), ale căror rezultate şi a căror reproductibilitate, deşi variază în raport cu originea tumorii, merită să fie luate în consideraţie.

Partea a treia a monografiei este consacrată elaborării unor scheme privind factorii terapeutici şi diagnostici anticanceroşi, dezvoltate în cuprinsul a trei capitole.

Capitolul referitor la încercările pentru stabilirea unei baze imunologice în regresia cancerului este urmat de un altul, privind bazele imunologice ale prevenirii cancerului, amîndouă reprezentînd, de fapt, expunerea punctului de vedere al lui E. Day în urma cercetărilor proprii, precum şi pe baza datelor recente ale literaturii de specialitate. Discutînd histoincompatibilitatea şi histocompatibilitatea sistemelor antigenice ale tumorii în fenomenul de transplant, autorul ajunge la concluzia că rezultatele obţinute în urma studierii acestor fenomene au îmbogăţit cunoştinţele despre imunitatea de transplant, dar prea puţin pe cele privind imunitatea cancerului spontan. În ceea ce priveşte prevenirea cancerului, experienţele efectuate de C. Friend (1959), L. J. Old şi colaboratori (1963) nu sînt concludente, deoarece în încercările acestor autori de a prepara vacinul împotriva virusului Friend prezent în leucemia şoarecilor tratamentul cu formol, pe lîngă inactivarea virusului, ar putea în acelaşi timp să altereze produsele celulare.

Seroterapia cancerului uman se află încă la începuturile ei şi autorul descrie doar cîteva experimente în acest domeniu. Astfel, S. De Carvalho (1963) obţine anticorpi antiţesut normal de om prin imunizarea cailor cu un amestec de ţesut normal. Acest antiser este apoi absorbit cu ţesut leucemic uman în scopul precipitării substanţelor aparţinînd ţesutului normal. Preparatul obţinut este apoi inoculat altui cal, obţinîndu-se un ser antileucemic. Rezultatele lui De Carvalho nu sînt însă concludente.

W. F. Bale şi colaboratori (1962) aplică tehnica anticorpilor eteroimuni ca purtători ai unor cantităţi terapeutice de substanţă radioactivă. Bazîndu-se pe rolul şi cantitatea crescută de fibrină în tumoare, autorii au preparat anticorpi antifibrină radioiodaţi care s-au localizat în tumoare. Însuşi E. Day utilizează tehnica radioanticorpilor în tratamentul tumorilor, anticorpi pe care a reuşit să-i localizeze în tumori cerebrale. Pe acelaşi principiu, J. F. Burke (1964) a reuşit să obţină anticorpi asociaţi cu substanţe chimioterapice, obţinînd reacţii violente la nivelul tumorii în raport cu modul de administrare a anticorpilor şi a agentului chimioterapic.

Acestor rezultate, deşi modeste, autorul le prevede o mare dezvoltare, deoarece permit preconizarea unui mod de abordare mai concret în seroterapia cancerului.

În sfîrşit, partea a patra a monografiei conţine descrierea în amănunt a următoarelor tehnici imunochimice :

— tehnica imunofiltrării, comunicată autorului direct de către G. I. Abelev ;

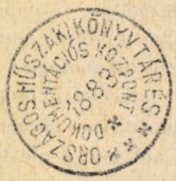
— prepararea anticorpilor radioactivi (radioanticorpi) ;

— matematica absorbţiei anticorpilor, o prezentare a modului de lucru cu diluţiile întrebuinţate în cercetarea serologică a cancerului.

O bogată bibliografie şi un aspect grafic îngrijit fac deosebit de utilă şi plăcută lecturarea acestei cărţi.

Prin publicarea cărţii *The immunochemistry of Cancer*, profesorul Eugene Day a adus un serviciu considerabil luptei împotriva cancerului şi a scos încă o dată în evidenţă rolul important şi de viitor pe care imunochimia îl are în rezolvarea problemelor medicinii actuale.

Valeriu V. Micuşan
Laboratorul de chimie biologică I,
I.M.F., Bucureşti



15

„Studii şi cercetări de biochimie" publică articole originale, de nivel ştiinţific superior, din toate domeniile biochimiei. Sumarele revistei sînt completate cu alte rubrici, ca : *Viaţa ştiinţifică*, în care, prin scurte note, sînt aduse la cunoştinţă cititorilor unele manifestări ştiinţifice din domeniul biochimiei : congrese, simpozioane, consfătuiri, schimburi de experienţă între cercetătorii români şi cei străini etc. ; *Recenzii* — în care sînt prezentate cele mai recente lucrări de specialitate apărute în ţară şi peste hotare.

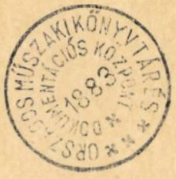
NOTĂ CĂTRE AUTORI

Autorii sînt rugaţi să înainteze articolele, notele şi recenziile dactilografiate la două rînduri. Tabelele vor fi dactilografiate pe pagini separate, iar diagramele vor fi executate în tuş, pe hîrtie de calc. Tabelele şi ilustraţiile vor fi numerotate cu cifre arabe. Figurile din planşe vor fi numerotate în continuarea celor din text. Se va evita repetarea acelorași date în text, tabele şi grafice. Explicaţia figurilor va fi dactilografiată pe pagină separată. Citarea bibliografiei în text se va face în ordinea numerelor. Numele autorilor va fi precedat de iniţiale. Titlurile revistelor citate în bibliografie vor fi prescurtate conform uzanţelor internaţionale.

Autorii au dreptul la un număr de 50 de extrase, gratuit.

Responsabilitatea asupra conţinutului articolelor revine în exclusivitate autorilor.

Corespondenţa privind manuscrisele, schimbul de publicaţii etc. se va trimite pe adresa Comitetului de redacţie : str. Docenţilor, nr. 20, Bucureşti 2, Raionul 30 Decembrie.



1966 MAR 14

Lucrări apărute în Editura Academiei Republicii Socialiste România

IONEL HAIDUC, **Introducere în chimia ciclurilor anorganice**, 339 p., 16 lei.

C. D. NENIȚESCU, I. P. CANTUNIARI și I. G. DINULESCU, **Nomenclatura chimiei organice**, 96 p., 3,65 lei.

ILIE VASILESCU, **Enzimele**, 429 p., 22,80 lei.

R. PORTOCALĂ și N. I. IONESCU, **Microscopia electronică în biologie și inframicrobiologie**, 180 p., 9,90 lei.

C. VELICAN, DOINA VELICAN și N. CARP, **Histochimia mucopolizaharidelor**, 285 p. + 24 pl., 20 lei.

C. BODEA și colab., **Tratat de biochimie vegetală**, vol. I, 747 p. + 4 pl. + 2 pl. color, 41 lei.

I. CANTACUZINO, **Opere alese**, 687 p. + 4 pl. color, 44 lei.

ST. CERC. BIOCHIMIE, TOMUL 9, NR. 1, P. 1 — 120, BUCUREȘTI, FEBRUARIE 1966

I. P. Informația, — c. 5057

43816

Lei 12 —

E 1330 ?

studii şi cercetări de biochimie

2

TOMUL 9

1966

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

St. cerc. biochimie, tomul 9, nr. 2, 121—228, Bucureşti, aprilie 1966

COMITETUL DE REDACȚIE

Redactor responsabil:

ACADEMICIAN E. MACOVSCHI

Redactor responsabil adjunct:

H. SLUȘANSCHI

Membri:

S. OERIU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; EUGENIA SORU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; M. MEZINCESCU, I. VASILESCU, TR. RĂDULESCU, VICTORIA ALEXANDRESCU.

Secretar de redacție:

VICTOR GHEȚIE

Revista apare de 4 ori pe an.

Prețul unui abonament anual este de 48 lei.

În țară abonamentele se fac la oficiile poștale, agențiile poștale, factorii poștali și difuzorii voluntari din întreprinderi și instituții.

Orice comandă din străinătate (numere izolate sau abonamente) se face prin: CARTIMEX, Căsuța poștală 134—135, București, Republica Socialistă România, sau prin reprezentanții săi din străinătate.

Manuscrisele, cărțile și revistele pentru schimb, precum și orice corespondență se vor trimite pe adresa comitetului de redacție al revistei „Studii și cercetări de biochimie"

ADRESA REDACȚIEI:

București, *str. Docenților nr. 20*
Raionul 30 Decembrie

STUDII ŞI CERCETĂRI DE
BIOCHIMIE

Tomul 9 (1966) Nr. 2

ORSZÁGOS MŰSZAKI KÖNYVTÁR ÉS DOKUMENTÁCIÓS KÖZPONT 1883

SUMAR

Pag.

E. MACOVSCHI, Teoria structurii şi repartiţia electroliţilor între lichidul de perfuzie şi muşchii trenului posterior de broască 123

I. MANTA, O. BÎRZU, R. POP, I. BODEA, Cercetări asupra rolului nucleului în procesul de respiraţie celulară 139

S. COMOROŞAN, S. SOLOMON, S. VIERU, M. STĂNESCU, Relaţii între activitatea enzimatică la nivel subcelular şi detergenţi, macroanioni şi solvenţi neapoşi 147

V. FRUNZETI, Introducerea şi translocarea acidului ribonucleic din *Saccharomyces cerevisiae* şi a acidului dezoxiribonucleic din seminţe de tutun Bel 61—10, în plante de tomate 167

C. REICHEL, E. LUKÁCS, E. LAPOHOS, A. KAPUSI, E. MÓDY, ŞT. SZABÓ, Studiu electroforetic şi imunochimic al extractului de ţesut excitoconductor cardiac 181

S. POPESCU, I. SZÁNTAY, Cercetarea metabolismului proteic în neuroza generală vegetativă cu iod-albumină marcată 187

NOTĂ DE LABORATOR

EUG. PĂUNESCU, Metodă colorimetrică rapidă de dozare a grupărilor aminice libere în produsele biologice 191

REFERATE GENERALE

I. MANTA, Fracţiunile subcelulare în metabolismul medicamentelor 197

D. TĂNĂSESCU, Glicoliza şi reglarea sa enzimatică în cursul contracţiei musculare 207

RECENZIE 225

St. cerc. biochimie, tomul 9, nr. 2, p. 121 — 228, Bucureşti, aprilie 1966

ST. CERC. BIOCHIM., 9, 2, 123–137 (1966)

ORSZÁGOS MŰSZAKI KÖNYVTÁR ÉS DOKUMENTÁCIÓS KÖZPONT 1883

TEORIA STRUCTURII ŞI REPARTIŢIA ELECTROLIŢILOR ÎNTRE LICHIDUL DE PERFUZIE ŞI MUŞCHII TRENULUI POSTERIOR DE BROASCĂ

ACAD. PROF. DR. EUGEN MACOVSCHI

616.6

Rezumat. — Au fost examinate, de pe poziţiile teoriei structurii, datele experimentale obţinute de R. Mond şi K. Amson cu privire la repartiţia ionilor de potasiu şi clor între lichidul de perfuzie şi muşchii trenului posterior de broască. S-a constatat că, spre deosebire de teoria membranei, această nouă teorie permite explicarea cauzelor care determină schimburile ionice între lichidul de perfuzie şi muşchi, precizarea semnificaţiei biochimice şi fiziologice a pragului de potasiu descoperit de R. Mond şi K. Amson, şi valorificarea cantitativă a rezultatelor experimentale în legătură cu interpretarea lor fizico-chimică.

Într-o lucrare precedentă [1] au fost publicate bazele unei noi teorii a permeabilităţii celulare — teoria structurii — izvorîtă din concepţia că protoplasma vie este alcătuită din două feluri de materie fundamental deosebite ca structură şi însuşiri : materia vie şi materia nevie, şi că materia vie, prin conţinutul său în anumiţi electroliţi, cauzează asimetria distribuţiei electroliţilor între protoplasmă şi lichidul interstiţial. Pentru a aduce argumente în sprijinul teoriei structurii şi, prin aceasta, în favoarea concepţiei despre existenţa în protoplasmă a unei materii vii, se poate recurge atît la efectuarea de noi cercetări experimentale, cît şi la reconsiderarea de pe poziţiile teoriei structurii a rezultatelor experimentale obţinute de acei autori care, deşi şi-au bazat cercetările pe alte concepţii teoretice sau au urmărit rezolvarea altor probleme, au obţinut totuşi date conforme cu noua teorie. Dintre numeroasele lucrări de felul acesta am ales, pentru început, o lucrare publicată în 1928 de R. Mond şi K. Amson [2]. În această lucrare, autorii menţionează că ,,după analizele efectuate de Katz, cationul cel mai răspîndit în muşchi este potasiul, iar sodiul se găseşte în cantitate foarte redusă, aflîndu-se — după Urano şi Fahr — în cea mai mare parte, dacă nu exclusiv, în lichidul interstiţial. Anionul principal al muşchilor este fosfatul, chiar dacă se ia în consideraţie că — după Adler — o parte a acidului fosforic total este legată de substanţe organice şi cuprinsă în lactacidogen. În schimb, după cum este cunoscut, lichidul interstiţial

conţine ioni de sodiu şi clor în concentraţie foarte mare. Prin urmare, există mari deosebiri în repartiţia electroliţilor între celulele musculare şi mediul exterior. Acestui fapt nu i s-a dat pînă acum (adică pînă în 1928 !) o explicaţie satisfăcătoare" [2, p. 71] şi, trebuie s-o recunoaştem, nu i s-a dat nici pînă azi. De altfel, este semnificativă propoziţia cu care începe o lucrare publicată recent de L. J. Opit şi J. S. Charnock [3] : „Deşi dispunem de numeroase date experimentale relativ la ieşirea ionilor de sodiu şi acumularea celor de potasiu în celulele vii, cunoştinţele noastre relativ la mecanismul respectiv sînt rudimentare, iar baza moleculară a acestui fenomen rămîne necunoscută" [3, p. 471].

Or, stabilirea cauzelor şi mecanismelor repartiţiei asimetrice a electroliţilor între celulele vii şi lichidul interstiţial, constituie una din problemele fundametale ale biologiei. De rezolvarea ei depinde cunoaşterea naturii excitabilităţii — una dintre însuşirile caracteristice ale protoplasmei vii — şi lămurirea atît a mecanismului permeabilităţii celulare, factor important în reglarea metabolismului, cît şi a fenomenelor bioelectrice, factor esenţial în activitatea celulelor nervoase, transmiterea sinaptică a excitaţiilor, procesul de secreţie şi absorbţie de la nivelul tractului gastro-intestinal etc. [4, p. 143] ,[5, p. 31]. Toate acestea justifică numeroasele cercetări experimentale care se mai efectuează şi astăzi în domeniul menţionat, pe baza unor concepţii teoretice diferite, printre care teoriei membranei îi revine un rol deosebit de important, şi tocmai în această categorie de lucrări se încadrează cercetările cu privire la repartiţia diferiţilor ioni între lichidul de perfuzie şi muşchii trenului posterior de broască, întreprinse de R. Mond şi K. Amson [2].

S-a recurs la metoda perfuziei, deoarece în preparatele trenului posterior de broască, destinate perfuziei, muşchii continuă să se afle în condiţii oarecum apropiate de cele normale, iar realizarea acestor preparate nu necesită nici o intervenţie directă asupra muşchilor respectivi; faptul acesta este de o importanţă deosebită, dată fiind marea sensibilitate a fibrelor musculare la orice acţiune externă şi la orice modificare a condiţiilor mediului în care se găsesc. Suprafaţa mare de contact dintre sistemul vaselor capilare sanguine şi muşchi asigură realizarea unui schimb rapid de substanţe între lichidul de perfuzie şi fibrele musculare. Soluţia de perfuzie vine în contact aproape simultan cu toate fibrele muşchiului, independent de profunzimea la care ele se află. Rapiditatea cu care se instalează echilibrul între substanţele aflate în lichidul de perfuzie şi cele din muşchi face ca durata experienţelor să fie minimă. Reînoirea continuă a lichidului de perfuzie introdus în muşchi permite menţinerea practic constantă a concentraţiei substanţelor dizolvate în acest lichid [2, p. 72, 73]. Socotim că la toate aceste argumente mai trebuie adăugat încă unul; în metoda perfuziei, schimbul de substanţe între muşchi şi lichidul de perfuzie se realizează prin aceleaşi formaţiuni histo-citologice prin care se produc schimburile naturale de substanţe între muşchi şi sînge.

Datorită acestor motive, metoda perfuziei pare a fi mai indicată ca mijloc de cercetare a permeabilităţii fibrelor musculare pentru diferite substanţe, decît metoda cufundării muşchilor excizaţi în soluţiile substanţelor respective. În adevăr, în cazul din urmă muşchii sînt puşi în condiţii

de existenţă cu totul anormale, iar izolarea lor din organism este însoţită de diferite leziuni, dintre care unele sînt de neevitat. Suprafaţa de contact între muşchi şi soluţie este relativ mică, aşa că schimbul de substanţe se face încet. Soluţia vine în contact numai cu periferia muşchiului, ceea ce face ca realizarea echilibrului între concentraţiile substanţei din soluţie şi din muşchi să necesite un timp îndelungat, urmare fiind durata mare a experienţelor. Menţinerea concentraţiei constante a substanţelor din soluţie implică folosirea unor cantităţi relativ mari de soluţie şi agitarea continuă a acesteia [2, p. 72]. La toate acestea mai adăugăm că în metoda cufundării muşchiului excizat în soluţii schimburile de substanţe între soluţie şi muşchi se fac prin alte elemente constitutive ale muşchiului decît acelea care participă în mod normal la astfel de schimburi între muşchi şi sînge.

Modul de experimentare. „După distrugerea sistemului nervos central, esculentele (în majoritate femele) au fost curăţate de organe. O canulă fină, legată printr-un tub de cauciuc de o sticlă Mariotte cu soluţia de perfuzie, se introducea în Aorta descendens. O altă canulă, pentru colectarea lichidului de perfuzie, se introducea în Vena abdominalis. Presiunea lichidului în cursul perfuziei era de 10—12 cm apă. Menţinerii acestei presiuni joase i s-a acordat o atenţie deosebită, deoarece experienţa îndelungată a arătat că la presiuni prea mari se produc mai totdeauna leziuni. La presiuni mici edemele nu apar niciodată. La început se perfuza un sfert de oră pentru înlocuirea cantităţii principale a sîngelui şi a lichidului interstiţial. Numai cantităţile de lichid următoare se utilizau pentru cercetarea propriu-zisă. Acest lichid era lăsat să curgă în eprubete de centrifugă şi se centrifuga înainte de analiză, deoarece chiar şi după un timp mai îndelungat lichidul de perfuzie mai antrenează unele hematii care mai rămîn în materialul perfuzat. Pentru realizarea unor diferenţe de concentraţie cît mai mari între lichidul iniţial şi cel trecut prin muşchi, perfuzia se făcea foarte încet. Durata perfuziilor şi cantităţile de lichid obţinute sînt arătate în tabele. Soluţia Ringer folosită la început avea următoarea compoziţie: NaCl 0,65%, KCl 0,02%, $CaCl_2$ 0,02%, $NaHCO_3$ 0,04%. Modificările acestei compoziţii sînt arătate în tabele. Cercetările s-au efectuat în lunile mai—iulie" [2, p. 73].

„La început perfuzia s-a făcut cu soluţii Ringer a căror compoziţie în ionii de potasiu, clor şi calciu varia în anumite limite, însă nu atît de mult încît să provoace modificări ale permeabilităţii. Dacă vreo substanţă nu pătrunde în muşchi, ar fi de aşteptat ca concentraţia ei în lichid să nu varieze în cursul perfuziei. Aceasta însă se va realiza numai în cazul cînd presiunea osmotică a lichidului de perfuzie va corespunde exact cu aceea din fibrele musculare. Noi însă am observat la muşchi manifestări ale unor variaţii mici de presiune osmotică, dependente probabil de metabolism; de aceea, modificările mici ale concentraţiilor substanţelor care nu pătrund în muşchi în cursul perfuziei se datoresc unor schimburi de apă între muşchi şi lichid. În al doilea rînd, nici în cazul perfuziilor celor mai atent efectuate nu se poate ajunge ca toate domeniile capilare să fie perfuzate uniform. Nu toate domeniile capilare sînt deschise simultan, şi tocmai de aceea se observă că în lichidul de perfuzie ce se scurge din venă reapar citeodată hematii, deşi înainte de aceasta lichidul se scurgea timp îndelungat complet incolor. Prin urmare, în cursul perfuziei lichidul se amestecă cu cantităţi mici de plasmă sanguină şi cu lichid interstiţial [1, p. 73], care nu au fost în prealabil îndepărtate şi a căror compoziţie nu corespunde în toate cazurile aceleia a lichidului de perfuzie. Aceşti factori trebuie luaţi în considerare la valorificarea cercetărilor. Ei fac ca şi în cazurile perfuziei cu substanţe care nu pătrund în muşchi să apară modificări de concentraţie de cîteva procente" [2, p. 74].

Datele experimentale obținute de R. Mond și K. Amson în cazul ionilor de potasiu și clor sînt cuprinse în tabela nr. 1. Pentru interpretarea lor, autorii au recurs la teoria membranei, după care protoplasma este o soluție apoasă (lichid intracelular) (postulatul 1.1.), toată apa protoplasmei este apa liberă, care nu se deosebește ca stare și însușiri de apa obișnuită (postulatul 1.2.), iar electroliții protoplasmei sînt dizolvați integral în apa liberă a lichidului intracelular, aflîndu-se în ea în stare disociată, ca ioni liberi, difuzibili (postulatul 1.3.) [1].

Tabela 1

Concentrațiile ionilor de potasiu și clor în soluțiile Ringer înainte și după perfuzia mușchilor trenului posterior de *Rana esculentă*

Nr.	mg K·% înainte de perfuzie	mg K·% după perfuzie	Modificarea procentuală a compoziției lichidului de perfuzie	mg Cl′% înainte de perfuzie	mg Cl′% după perfuzie	Modificarea procentuală a compoziției lichidului de perfuzie	Durata perfuziei (minute)	Cantitatea lichidului perfuzat (cmc)
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	31,9	26,4	−17,2	380,5	350,3	−7,9	60	14
2	30,7	24,7	−19,5	384,0	400,8	+4,3	50	9
3	23,9	20,4	−14,6	368,0	373,0	+1,4	50	10
4	17,5	14,1	−19,4	—	—	—	60	12
5	14,3	13,2	− 7,7	416,9	408,0	−2,7	50	11
6	12,5	13,0	+ 4,0	—	—	—	60	14
7	11,5	15,0	+30,2	—	—	—	60	12
8	8,3	10,6	+27,7	371,0	371,0	±0	60	10
9	8,2	10,9	+33,0	391,0	377,0	−3,6	60	10

În aceste condiții, cantitatea de potasiu aflată în unitatea de volum al țesutului muscular și în prima aproximație a protoplasmei exprimă totodată și concentrația ionilor acestui element și, cum în mușchii striați de broască această cantitate este de aproximativ 324 mg%[1], înseamnă că în conformitate cu teoria membranei, concentrația ionilor de potasiu în protoplasma musculară este și ea de 324 mg%. Așa fiind ar fi fost de așteptat ca perfuziile trenului posterior de broască cu soluții Ringer cu concentrații mici de ioni de potasiu, cuprinse între 31,9 și 8,2 mg%, deci mult inferioare concentrației din mușchi (324 mg%), să fie însoțite de o trecere a potasiului muscular în lichidul de perfuzie și de creșterea concentrației ionilor de potasiu în acest lichid. Datele experimentale cuprinse în tabela nr. 1, coloanele 2, 3 și 4, arată însă cu totul alt rezultat. În cazul cînd „lichidul de perfuzie conține potasiul în concentrație de aproximativ 13 mg%, nu se produce nici o modificare a concentrației potasiului în acest

[1] De exemplu : 1Kg musculatură proaspătă de broască conține, după A. Katz, 3,08 g potasiu [6], [7] adică 308 mg%; iar după W. Fenn, 83 mM potasiu [8], adică 324 mg%. Ultima cifră va fi folosită în calculele ce vor urma.

lichid. Mărirea conţinutului de potasiu în soluţia Ringer face ca potasiul să fie preluat de muşchi, iar micşorarea concentraţiei sub 13 mg% face ca potasiul să fie cedat de către muşchi" [2, p. 74].

„Această constatare — scriu R. Mond şi K. Amson — este cu atît mai surprinzătoare, cu cît potasiul se află în muşchi în concentraţie cu mult mai mare şi, prin urmare, este preluat de muşchi din lichidul de perfuzie contra gradientului de concentraţie, dacă concentraţia lui în lichidul de perfuzie depăşeşte valoarea prag m (13 mg%) cu care conţinutul de potasiu al fibrei musculare este în echilibru [2, p. 74]. „Semnificaţia probabilă a acestui prag de potasiu (Kaliumschwelle)" [2, p. 76] precum şi „cauza acumulării surprinzătoare a potasiului în celule, trebuiesc căutate — după R. Mond şi K. Amson — în aceea că menţinerea diferenţei mari de concentraţie a potasiului între interiorul şi exteriorul fibrei musculare se realizează prin cationii de $H^{\cdot}$ şi $NH_4^{\cdot}$ uşor difuzibili, care formîndu-se în cadrul metabolismului celular, pot realiza schimbul cu ionii de potasiu, determinînd astfel aducerea acestora în celule" [2, p. 81). Alte precizări cu privire la mecanismul de acumulare a potasiului în celulele musculare şi la eventuala semnificaţie a pragului de potasiu, descoperit de R. Mond şi K. Amson [2, p. 85] nu au fost date.

De altfel, se ştie că diferenţa mare dintre concentraţia ionilor de potasiu din protoplasmă (324 mg%) şi aceea din plasmă, deci, în prima aproximaţie, din lichidul interstiţial (9,8 mg%)[2], este explicată de teoria membranei în modul următor : raportul dintre aceste concentraţii corespunde unei stări de dezechilibru (concluzia 1.3.) care se menţine datorită capacităţii speciale a membranei electrice celulare de a transporta continuu şi selectiv ionii de potasiu din lichidul interstiţial în protoplasmă (concluzia 1.4.) cu ajutorul unui mecanism numit pompa de sodiu şi potasiu (concluzia 1.5.), acţionat de energia provenită din metabolismul celular (concluzia 1.6.) [1].

Rezultă că interpretarea de pe poziţiile teoriei membranei a datelor experimentale privitoare la comportarea ionilor de potasiu duce la următoarele concluzii şi constatări :

1. Membranele fibrelor musculare sînt permeabile pentru ionii de potasiu.

2. Deşi concentraţia ionilor de potasiu în lichidul de perfuzie este cu mult mai mică decît în celulele musculare, totuşi ea nu se modifică în cursul perfuziei dacă este de aproximativ 13 mg% (această concentraţie reprezintă pragul de potasiu descoperit de R. Mond şi K. Amson).

3. Semnificaţia biochimică şi fiziologică a pragului de potasiu nu a fost lămurită.

4. Dacă în lichidul de perfuzie concentraţia ionilor de potasiu depăşeşte pragul, adică este mai mare de 13 mg%, atunci ionii de potasiu pătrund din lichid în muşchi contra gradientului de concentraţie, şi numai dacă concentraţia menţionată este sub prag, adică mai mică de 13 mg%, ionii de potasiu trec din muşchi în lichid.

---

[2] După W. Fenn [8] concentraţia potasiului în plasma sanguină de broască este de 2,5 mM la Kg, adică 9,8 mg%.

5. Cauzele schimburilor de ioni de potasiu între lichidul de perfuzie şi muşchi, mai ales acelea ale pătrunderii lor în muşchi contra gradientului de concentraţie, nu au fost explicate, iar referirea la eventuala participare la schimburile de mai sus a ionilor de hidrogen şi amoniu rezultaţi din metabolismul celular, a avut un caracter prezumtiv.

6. Teoria membranei permite numai o valorificare calitativă a datelor analitice cuprinse în tabela 1.

Să examinăm acum de pe poziţiile teoriei structurii datele experimentale obţinute de R. Mond şi K. Amson.

Spre deosebire de teoria membranei, această teorie se bazează pe următoarele postulate : protoplasma este un ansamblu alcătuit din materie vie şi materie nevie (ansamblul protoplasmatic) (postulatul 3. 1.); apa protoplasmei se află sub trei forme diferite : o parte este integrată în structura materiei vii şi nu are însuşiri de solvent, o altă parte îmbibă materia vie (apa de imbibiţie) şi se comportă ca un fel de apă legată, deosebită ca fază, stare şi însuşiri de solvent de apa liberă obişnuită; în fine, o parte se află în materia nevie a protoplasmei, comportîndu-se ca apa liberă obişnuită (postulatul 3. 2.); electroliţii protoplasmei sînt în parte integraţi în structura materiei vii, în parte sînt adsorbiţi la nivelul materiei vii şi pe coloizii aflaţi în materia nevie, şi numai o parte sînt dizolvaţi atît în apa de imbibiţie a materiei vii cît şi în apa liberă a materiei nevii, aflîndu-se aici în stare disociată, ca ioni difuzibili (postulatul 3. 3) [1].

Se înţelege că în aceste condiţii, există o deosebire între cantitatea totală de potasiu celular şi cantitatea ionilor acestui element dizolvaţi în apa materiei nevii a protoplasmei. Totodată, este de reţinut că concentraţia ionilor de potasiu în apa materiei nevii a protoplasmei depinde de volumul acestei fracţiuni a apei celulare. De asemeni, trebuie luat în considerare că în conformitate cu teoria structurii o parte a potasiului celular este inclusă în structura materiei vii (concluzia 3. 4.), iar concentraţia ionilor de potasiu în apa materiei nevii a protoplasmei este, principial, egală cu aceea din lichidul interstiţial (concluzia 3. 1.) cu care se află în echilibru de difuzie (concluzia 3. 3.) [1]. Or, toate acestea permit nu numai o nouă interpretare a rezultatelor experimentale obţinute de R. Mond şi K. Amson, şi înţelegerea mecanismului fenomenelor de schimb ionic între muşchi şi lichidul de perfuzie, ci şi precizarea anumitor raporturi între unele fracţiuni ale potasiului şi ale apei celulare repartizate între materia vie şi materia nevie a protoplasmei.

Pentru simplificarea deducţiilor vom face, pentru moment, abstracţie de apa de imbibiţie a materiei vii, de adsorbţia electroliţilor atît la nivelul materiei vii cît şi al coloizilor aflaţi în materia nevie a protoplasmei, precum şi de prezenţa acestor coloizi. După cum se va arăta într-o altă lucrare, factorii aceştia joacă, în general, un rol secundar şi pot fi neglijaţi în primă aproximaţie, urmînd să se ţină seama de ei mai ales în lucrările de precizie. De aceea, în consideraţiile următoare ne vom referi numai la apa cuprinsă în structura materiei vii, la apa liberă din materia nevie a protoplasmei, la potasiul cuprins în structura materiei vii şi la ionii de potasiu aflaţi sub formă de soluţie în apa materiei nevii.

Să admitem acum că în protoplasma musculaturii trenului posterior de broască volumul ocupat de apa liberă a materiei nevii este de v ml şi că în acest volum de apă se află sub formă de soluţie a mg ioni de potasiu. În acest caz, concentraţia c a ionilor de potasiu în apa liberă a materiei nevii exprimată în mg/ml este c = a/v. Începem perfuzia cu o soluţie Ringer în care concentraţia C a ionilor de potasiu este mai mare decît concentraţia c. Datorită diferenţei de concentraţie C — c, ionii de potasiu pătrund prin difuzie în muşchi, ceea ce duce la creşterea concentraţiei lor în apa materiei nevii a muşchilor şi la scăderea concentraţiei lor în lichidul de perfuzie. Cum, pe măsura pătrunderii ionilor de potasiu în muşchi, concentraţia lor în apa materiei nevii devine tot mai mare, diferenţa de concentraţie faţă de lichidul de perfuzie se micşorează, ceea ce face ca pătrunderea ionilor de potasiu în muşchii perfuzaţi să devină din ce în ce mai înceată, iar concentraţia ionilor de potasiu în lichidul ce se scurge din musculatura perfuzată să devină tot mai apropiată de concentraţia iniţială a acestui lichid. Astfel pînă la urmă cînd concentraţia ionilor de potasiu în apa liberă a materiei nevii din protoplasma musculară devine egală cu concentraţia ionilor de potasiu din lichidul de perfuzie, acest lichid trece prin musculatura trenului posterior de broască fără să-şi mai modifice concentraţia. Se înţelege că această stare de echilibru de difuzie între cele două medii lichide se realizează fiindcă în apa materiei nevii a protoplasmei pătrunde o anumită cantitate b de ioni de potasiu care, adăugîndu-se la cantitatea a existentă aici înainte de perfuzie, face ca concentraţia ionilor de potasiu din apa liberă a materiei nevii a musculaturii perfuzate să devină egală cu concentraţia C a lichidului de perfuzie :

$$\frac{a+b}{v} = C, \tag{1}$$

ecuaţie care poate fi prezentată sub forma :

$$b = cv - a, \tag{2}$$

respectiv :

$$b = \frac{Q}{100} v - a, \tag{3}$$

dacă exprimăm concentraţia C a ionilor de potasiu în lichidul de perfuzie prin cantitatea Q în mg a acestor ioni dizolvaţi în 100 ml de lichid.

În expresia (1) valorile a şi v nu ne sînt cunoscute. În schimb cunoaştem concentraţia C a ionilor de potasiu din lichidul de perfuzie aflat în echilibru de difuzie cu materia nevie a protoplasmei muşchilor (condiţie esenţială pentru valabilitatea ecuaţiilor 1 — 3), iar prin analiza lichidului de perfuzie care a trecut prin muşchi putem afla cantitatea b de ioni de potasiu care au pătruns în materia nevie a muşchilor, deoarece cunoaştem concentraţia iniţială a acestui lichid. De fapt : dacă prin muşchi au trecut n ml soluţie Ringer cu concentraţia ionilor de potasiu

Q/100, iar după perfuzie în acelaşi volum de lichid concentraţia ionilor menţionaţi a devenit q/100, înseamnă că în cei n ml de soluţie Ringer se aflau înainte de perfuzie P = nQ/100 mg ioni de potasiu, iar după perfuzie se află p = nq/100 mg. Diferenţa între P şi p reprezintă tocmai cantitatea ionilor de potasiu pătrunşi în muşchi, adică valoarea b :

$$P - p = \frac{nQ}{100} - \frac{nq}{100} = \frac{n(Q-q)}{100} = b \qquad (4)$$

Prin urmare, relaţia (1) sub forma ei (3) este o ecuaţie liniară cu două necunoscute a şi v, a cărei rezolvare necesită un sistem format din cel puţin două ecuaţii, în care b şi Q să reprezinte anumite valori numerice obţinute din cel puţin două determinări experimentale diferite. Or, tabela 1 conţine rezultatele a 9 perfuzii efectuate de R. Mond şi K. Amson cu soluţii Ringer ce conţineau ioni de potasiu în concentraţii diferite. Cum însă aceste rezultate pot fi grevate de erori experimentale, se impune să stabilim pe baza lor un sistem format din 9 ecuaţii de forma (3), pe care să-l reducem, aplicînd calculul statistic, la un sistem format din numai două ecuaţii. Prin rezolvarea acestora din urmă în raport cu necunoscutele a şi v, vom afla atît cantitatea a de ioni de potasiu dizolvaţi în apa liberă a materiei nevii din protoplasma muşchilor trenului posterior de broască, cît şi volumul v pe care apa materiei nevii îl ocupă în protoplasma muşchilor acestui tren. Înainte însă de a trece la efectuarea acestor calcule, menţionăm că — în conformitate cu cele constatate de R. Mond şi K. Amson — echilibrul între substanţele aflate în lichidul de perfuzie şi muşchi se instalează rapid (2, p. 72). Prin urmare, putem admite că în decursul celor 50 — 60 minute cît au durat perfuziile efectuate de autorii menţionaţi (tabela 1, col. 8) s-a ajuns la stabilirea echilibrului de difuzie între concentraţiile ionilor de potasiu din lichidul de perfuzie şi apa liberă a materiei nevii din protoplasma musculară, ceea ce înseamnă că condiţia de valabilitate a ecuaţiei (3) a fost satisfăcută.

Calculul a fost efectuat în modul următor:

Pe baza datelor experimentale cuprinse în tabela 1, coloanele 2, 3 şi 9, pentru fiecare experienţă s-a calculat cu ajutorul formulei (4) valoarea corespunzătoare b, ţinînd seama că cifrele cuprinse în coloana 2 reprezintă valorile Q, cele din coloana 3 reprezintă valorile q, iar cele din coloana 9 reprezintă valorile n.

De exemplu : în cazul experienţei nr. 1 se obţine pentru b valoarea :

$$b = \frac{n(Q-q)}{100} = \frac{14(31{,}9 - 26{,}4)}{100} = 0{,}770$$

Introducînd valorile b astfel calculate pentru fiecare experienţă în parte şi valorile corespunzătoare Q în formula (3), ajungem la sistemul format din 9 ecuaţii cu două necunoscute a şi v :

$$\begin{aligned}
0{,}770 &= 0{,}319\ v - a & -0{,}007 &= 0{,}125\ v - a\\
0{,}540 &= 0{,}307\ v - a & -0{,}420 &= 0{,}115\ v - a\\
0{,}350 &= 0{,}239\ v - a & -0{,}230 &= 0{,}083\ v - a\\
0{,}408 &= 0{,}175\ v - a & -0{,}270 &= 0{,}082\ v - a\\
0{,}121 &= 0{,}143\ v - a
\end{aligned}$$

Pentru rezolvarea acestui sistem de ecuaţii in raport cu necunoscutele a şi v se recurge la calculul statistic (9), conform căruia un sistem de N ecuaţii de forma

$$b = Qv - a$$

cu coeficienţii variabili b şi Q, şi cu două constante necunoscute a şi v, permite deducerea unui sistem de numai două ecuaţii :

$$\begin{aligned} \Sigma b &= v \Sigma Q - Na \\ \Sigma bQ &= v \Sigma Q^2 - a \Sigma Q \end{aligned} \qquad (5)$$

prin rezolvarea căruia se obţin valorile a şi v.

Cifrele principale care intervin în calculul valorilor coeficienţilor ecuaţiilor de mai sus sînt cuprinse în tabela 2.

Tabela 2

Valorile C, OQ, CQ, Q^2 in cazul ionilor de potasiu calculate pentru fiecare experienţă de perfuzie in parte

Nr.	b	Q	bQ	Q^2
1	0,770	0,319	0,2456	0,1018
2	0,540	0,307	0,1658	0,0942
3	0,350	0,239	0,0836	0,0571
4	0,408	0,175	0,0714	0,0306
5	0,121	0,143	0,0173	0,0204
6	−0,007	0,125	−0,0009	0,0156
7	−0,420	0,115	−0,0483	0,0132
8	−0,230	0,083	−0,0190	0,0069
9	−0,270	0,082	−0,0221	0,0067
	$\Sigma b = 1{,}262$	$\Sigma Q = 1{,}588$	$\Sigma bQ = 0{,}493$	$\Sigma Q^2 = 0{,}346$

Făcînd înlocuirile corespunzătoare ale simbolurilor din ecuaţiile (5) prin valorile numerice corespunzătoare din tabela 2, se ajunge la ecuaţiile :

$$1{,}262 = 1{,}588\ v - 9\ a$$
$$0{,}493 = 0{,}346\ v - 1{,}588\ a$$

a căror rezolvare în raport cu a şi v dă valorile :

$$a = 0{,}58 \text{ mg } K^{\bullet}$$
$$v = 4{,}1 \text{ ml}$$

Rezultatul calculului ne arată că musculatura trenului posterior de broască conţine în medie 0,58 mg ioni de potasiu dizolvaţi în 4,1 ml de apă a materiei nevii din protoplasmă. Prin urmare, concentraţia c a ionilor de potasiu în această apă este :

$$c = \frac{a}{v} = 0{,}14 \text{ mg/ml} = 14 \text{ mg\%}$$

Este de subliniat că această cifră corespunde tocmai valorii pragului de potasiu, descoperit de R. Mond şi K. Amson.

Dacă R. Mond şi K. Amson ar fi inclus în tabela 1 o rubrică cu datele privind masa musculară a fiecărui tren posterior de broască folosit în cercetare, s-ar fi putut afla prin calcul raportul dintre apa liberă a materiei nevii din protoplasmă şi apa de structură a materiei vii, precum şi raportul dintre diferitele fracţiuni ale potasiului celular. Cum însă datele respective lipsesc, nu ne-a rămas decît să căutăm o altă cale pentru deducerea, măcar aproximativă, a masei musculare medii prin care R. Mond şi K. Amson au efectuat perfuziile lor.

În acest scop am luat în considerare ionii care, probabil, nu participă la alcătuirea structurii materiei vii, cum sînt de exemplu ionii de clor. Asemenea ioni se pot afla numai în apa materiei nevii a protoplasmei unde concentraţia lor, conform teoriei structurii, trebuie să fie egală cu aceea din lichidul interstiţial (concluzia 3.3.) [1]. Înseamnă că, cunoscînd concentraţia ionilor de clor în lichidul interstiţial şi proporţia lor în ţesutul muscular, se poate calcula volumul apei materiei nevii aflat în 100 g ţesut, iar avînd în vedere că musculatura trenului posterior de broască conţine 4,1 ml din această apă, se poate deduce masa acestei musculaturi.

După W. Fenn [8] concentraţia ionilor de clor în plasma sanguină de broască este de 74,3 mM/kg, adică 264 mg Cl''%, iar în muşchii striaţi de broască proporţia acestor ioni este de 10,9 mM/kg, adică 39 mg Cl'%. Cum această cantitate de ioni de clor muscular este dizolvată în x ml apă liberă a materiei nevii şi cum concentraţia este egală cu aceea a lichidului interstiţial, ajungem (admiţînd pentru simplificare că concentraţia ionilor de clor din lichidul interstiţial este egală cu aceea din plasma sanguină) la relaţia :

$$\frac{264}{100} = \frac{39}{x},$$

care permite deducerea valorii x :

$$x = 15 \text{ ml}$$

Prin urmare 100 g ţesut muscular de broască conţine 15 ml apă liberă. Aşa fiind, regula de trei simplă permite să aflăm masa y a musculaturii trenului posterior de broască, în care, după cum s-a dedus din calculele de mai sus, se găsesc 4,1 ml de apă liberă.

$$y = \frac{4{,}1 \cdot 100}{15} = 27 \text{ g}$$

Rezultă că în cercetările efectuate de R. Mond şi K. Amson muşchii trenului posterior de broască cîntăreau în medie 27 g.

Dacă 27 g muşchi conţin, după cum s-a calculat, 0,58 mg ioni de potasiu dizolvaţi în 4,1 ml apă liberă a materiei nevii din protoplasmă, atunci în 100 g muşchi se află aproximativ 2 mg ioni de potasiu dizolvaţi în 15 ml apă a materiei nevii. Cum, în conformitate cu datele analitice

publicate de W. Fenn [8], 100 g muşchi de broască conţin 83 mM potasiu, adică 324 mg, înseamnă că aproape întreaga cantitate a potasiului muscular se află în structura materiei vii (322 mg) şi numai 2 mg, adică mai puţin de 1% din cantitatea totală a potasiului, sînt dizolvate în apa liberă a materiei nevii.

În ceea ce priveşte repartiţia apei între cele două feluri de materie din protoplasmă, situaţia se prezintă astfel : din moment ce — după W. Fenn (8) — 100 g muşchi de broască conţin 80 ml apă totală, iar calculul ne arată că din această cantitate de apă 15 ml reprezintă apa liberă, înseamnă că structura materiei vii din protoplasmă include 65 ml apă, adică aproximativ 81% din totalul ei.

Se înţelege că, în condiţiile în care au fost efectuate calculele de mai sus, rezultatul lor este mai mult estimativ şi valabil numai în primă şi foarte grosieră aproximaţie. Mai mult : calculele au fost efectuate pe baza datelor experimentale cuprinse în tabela 1 fără a ţine seamă că R. Mond şi K. Amson, din anumite motive, începeau culegerea lichidului de perfuzie numai după 15 minute de la începutul experienţei. Or, în acest interval de timp pătrundeau din lichid în muşchi, respectiv treceau din muşchi în lichid anumite cantităţi de ioni de potasiu care nu au fost cuprinse în calcul *. Prin urmare, în formula (1) valorile reprezentate prin simbolul b sînt în realitate mai mari decît cele rezultate din calcul. Dar, cu cît b este mai mare, cu atît a trebuie să fie mai mic. Prin urmare, valoarea reală a cantităţii ionilor de potasiu aflaţi în apa liberă a materiei nevii din musculatura trenului posterior de broască este mai mică decît 0,58 mg. Din aceleaşi motive, greutatea medie de 27 g a musculaturii trenului posterior de broască Rana esculenta — dedusă prin calcul — este prea mare şi de asemeni trebuie considerată ca foarte aproximativă. Se înţelege că determinarea mai precisă a valorilor mărimilor a şi v necesită efectuarea unor cercetări speciale, luîndu-se în considerare toţi factorii care intervin în calculul lor. Cercetările respective sînt în curs.

Rezultă că interpretarea de pe poziţiile teoriei structurii a datelor experimentale privitoare la comportarea ionilor de potasiu duce, cu excepţia primei concluzii relative la permeabilitatea fibrelor musculare, la cu totul alte concluzii şi constatări decît teoria membranei, şi anume :

1. Fibrele musculare sînt permeabile pentru ionii de potasiu.

2. Faptul că concentraţia ionilor de potasiu din soluţia Ringer nu se modifică în cursul perfuziei, dacă este de aproximativ 14 mg%, înseamnă că această concentraţie este egală cu aceea din apa materiei nevii a protoplasmei, ionii de potasiu din cele două medii fiind în echilibru de difuzie.

3. Astfel pragul de potasiu descoperit de R. Mond şi K. Amson, capătă o semnificaţie biochimică şi fiziologică evidentă.

4. Dacă în lichidul de perfuzie concentraţia ionilor de potasiu depăşeşte pragul, adică este mai mare de 14 mg%, atunci ionii de potasiu pătrund în muşchi deoarece concentraţia lor în apa liberă a materiei nevii

* Într-una din lucrările viitoare vom examina de pe poziţiile teoriei structurii, problema aşa numitelor „spaţii de clor, de potasiu, de galactoză" etc. cunoscute în fiziologia musculară, pentru a preciza semnificaţia lor.

din protoplasmă este mai mică; dacă însă concentraţia lor în lichidul de perfuzie este sub prag, adică mai mică decît 14 mg%, atunci ionii de potasiu trec din muşchi în acest lichid deoarece concentraţia lor în apa materiei nevii a muşchiului este mai mare.

5. Astfel, cauzele schimburilor ionilor de potasiu între lichidul de perfuzie şi muşchi capătă o explicaţie simplă, bazată pe fenomenele de difuzie condiţionate de diferenţele de concentraţie ale ionilor respectivi. De aceea, cînd examinăm din punctul de vedere al teoriei structurii datele experimentale obţinute de R. Mond şi K. Amson nu apare nici problema pătrunderii ionilor de potasiu în muşchi contra gradientului de concentraţie, nici necesitatea unor ipoteze suplimentare, cum este aceea a unei eventuale participări a ionilor de hidrogen şi amoniu rezultaţi din metabolismul celular, la schimbul ionilor de potasiu între lichidul de perfuzie şi muşchi.

6. Teoria structurii permite valorificarea cantitativă a datelor analitice cuprinse în tabela 1.

Trecem acum la problema permeabilităţii fibrelor musculaturii striate de broască pentru ionii de clor.

Datele experimentale obţinute de R. Mond şi K. Amson la perfuzia trenului posterior de broască cu soluţii Ringer cu un conţinut în ionii de clor de 270—420 mg% sînt cuprinse în tabela 1, coloanele 5, 6 şi 7. Examinarea lor arată că în cursul perfuziei concentraţia ionilor de clor în soluţiile respective aproape că nu se modifică. „Dacă luăm în consideraţie diferenţele procentuale mici şi neregulate ale conţinutului în ionii de clor înainte şi după perfuzie ajungem la concluzia că probabilitatea preluării acestor ioni de către muşchi este extrem de mică, deci există o diferenţă mare de concentraţie a ionilor de clor între lichidul extern şi fibra musculară" [2, p. 75]. În adevăr, cantitatea de clor din muşchii de broască este de 0,40 g la 1 kg de ţesut proaspăt, adică de 40 mg% [6] [7]*), ceea ce — conform teoriei membranei — reprezintă totodată şi concentraţia ionilor de clor în muşchi. Or, această concentraţie este aproximativ de 10 ori mai mică în comparaţie cu acelea din jurul valorii de 400 mg% ale soluţiilor Ringer folosite pentru perfuzii. În consecinţă, ar fi fost de aşteptat ca ionii de clor să treacă din lichidul de perfuzie în muşchi, ceea ce ar fi determinat scăderea considerabilă a concentraţiei lor în acest lichid. Cum însă s-a constatat că în cursul perfuziei concentraţia ionilor de clor din soluţiile Ringer nu prea suferă modificări, R. Mond şi K. Amson au dedus că „fibrele musculare sînt impermeabile pentru ionii de clor" [2, p. 75].

Să examinăm acum situaţia de pe poziţiile teoriei structurii.

Spre deosebire de teoria membranei, această teorie susţine că electroliţii celulari sînt dizolvaţi nu în apa totală a protoplasmei, ci numai în apa liberă a materiei nevii, deoarece apa cuprinsă în structura materiei vii nu are însuşiri de solvent (postulatul 3.2) [1]. Totodată, conform teoriei structurii, concentraţia ionilor în apa liberă a materiei nevii este principial egală cu aceea a ionilor corespunzători aflaţi în lichidul interstiţial (con-

*) Această cifră a fost confirmată ulterior şi de alţi autori. De exemplu, după W. Fann (8), muşchii striaţi de broască conţin 10,9 mM clor la 1 kg ţesut proaspăt, adică 39 mg Cl'%.

cluzia 3.1.) [1]. Înseamnă că cei 40 mg ioni de clor aflați în 100 g de țesut muscular sînt dizolvați nu în întreaga masă protoplasmatică, cum susține teoria membranei, ci numai în cei 15 ml de apă liberă a materiei nevii. În acest caz însă, concentrația ionilor de clor în apa materiei nevii a protoplasmei nu este de 40 mg%, ci de 266 mg%, cifră apropiată de aceea dată de W. Fenn [8] pentru plasma sangvină de broască, unde în 1 kg se află 74,3 mM clor, adică 263 mg Cl′%.

Rezultă de aici că, de exemplu, în experiența nr. 1 (tabela 1) perfuzia trenului superior de broască s-a făcut cu o soluție Ringer în care concentrația ionilor de clor, anume 380,5 mg%, era mai mare decît aceea din materia nevie a protoplasmei celulelor musculare (266 mg Cl′%). Ar urma deci ca o anumită cantitate a ionilor de clor din lichidul de perfuzie să fi pătruns în mușchi pînă la egalarea concentrațiilor. Să calculăm această cantitate, considerînd totodată că rezultatul ce se va obține va fi valabil și pentru celelalte experiențe de perfuzie efectuate de R. Mond și K. Amson, deoarece concentrațiile ionilor de clor în lichidele de perfuzie nu diferau prea mult între ele (de la 368,0 pînă la 416,9 mg% — tabela 1, coloana 5).

În conformitate cu calculele anterioare, musculatura trenului posterior de broască conține 4,1 ml apă liberă. Cum, după calculele făcute mai sus pe baza teoriei structurii, concentrația ionilor de clor în această apă este de 266 mg%, înseamnă că în cei 4,1 ml se află :

$$x = \frac{4{,}1 \cdot 266}{100} = 11 \text{ mg Cl}'.$$

Cînd concentrația lichidului de perfuzie este de 380,5 mg Cl′%, rezultă că 4,1 ml din acest lichid conțin :

$$y = \frac{4{,}1 \cdot 380{,}5}{100} = 15 \text{ mg Cl}'$$

Egalarea concentrațiilor ionilor de clor în cele două medii ar necesita deci pătrunderea îm mușchi a 15—11 = 4 mg ioni de clor, cantitate prea mică pentru a modifica în mod semnificativ cencentrația relativ mare a lichidului de perfuzie folosit în cercetările respective. În adevăr :

Concentrația ionilor de clor în soluțiile Ringer înainte de perfuzie fiind de 380,5 mg%, înseamnă că cei 14 ml perfuzați prin mușchi se află :

$$z = \frac{14 \cdot 380{,}5}{100} = 53{,}3 \text{ mg Cl}'$$

Dacă în mușchi pătrund conform calculelor de adineauri 4 mg ioni de clor, această cantitate ar trebui să scadă la : 53,3 — 4 = 49,3 mg Cl′, concentrația lichidului după perfuzie devenind :

$$w = \frac{49{,}3 \cdot 100}{14} = 352 \text{ mg Cl}'\%$$

Or, scăderea concentrației ionilor de clor în lichidul de perfuzie de la 380,5 mg% (tabela 1, coloana 5) la 350,3 mg% (tabela 1, coloana 6) adică la o valoare ceva mai mică decît cea dedusă de noi, cade — după R. Mond și K. Amson — în limitele erorilor experimentale și, în condițiile cercetărilor lor, nu poate fi luată în considerație. Totodată, trebuie să se țină seama că în cazul ionilor de clor calculul de mai sus a arătat întreaga cantitate a acestor ioni pătrunsă din lichidul de perfuzie în mușchi, începînd din primele momente ale perfuziei. Or, după cum s-a subliniat, R. Mond și K. Amson preluau lichidul pentru analiză abia la cinsprezece minute după începutul perfuziei. Cum însă cantitatea ionilor de clor care pătrundeau ulterior în mușchi era mai mică decît la început, deci sub 4 mg este ușor de înțeles de ce majoritatea datelor analitice obținute în aceste condiții (tabela 1, coloanele 5, 6) nu prezintă decît diferențe minime ale concentrațiilor înainte și după perfuzie (între −3,6 și +4,3%) (tabela 1, coloana 7) [2].

Astfel, spre deosebire de teoria membranei care duce la concluzia că membranele fibrelor musculare sînt impermeabile pentru ionii de clor, teoria structurii explică motivele datorită cărora concentrația acestor ioni în lichidul de perfuzie nu se modifică în mod semnificativ în condițiile cercetărilor efectuate de R. Mond și K. Amson și arată că rezultatele experimentale obținute de acești autori nu pot servi ca o dovadă impermeabilității fibrelor celulelor musculare pentru ionii menționați.

ÎNCHEIERE

Pentru a aduce argumente în sprijinul teoriei structurii și al concepțiilor care stau la baza acestei teorii, s-au examinat datele experimentale obținute de R. Mond și K. Amson cu privire la repartiția ionilor de potasiu și clor între lichidul de perfuzie și mușchii trenului posterior de broască.

S-a constatat că teoria structurii permite o cu totul altă interpretare a rezultatelor experimentale menționate, explică mecanismul și cauzele care determină schimburile ionice între lichidul de perfuzie și mușchi, precizează semnificația biochimică a pragului de potasiu descoperit de R. Mond și K. Amson.

Calculele efectuate pe baza teoriei structurii au dus la estimarea raporturilor dintre diferitele fracțiuni ale apei și ale potasiului celular repartizate între materia vie și materia nevie a protoplasmei. Cifrele obținute sînt însă prea mari, deoarece nu s-au putut lua în considerație toți factorii necesari efectuării calculelor exacte. Interesează însă nu valoarea absolută a mărimilor calculate pe baza datelor experimentale obținute în condițiile unor cercetări efectuate de pe alte poziții teoretice și incomplete din noul punct de vedere, ci faptul că teoria structurii permite efectuarea unor astfel de calcule bazate pe intuirea naturii fenomenelor de schimburi ionice care, în timpul perfuziei, se produc între lichidul respectiv și mușchi. De asemeni, importantă este și constatarea că — spre deosebire de teoria membranei — teoria structurii a permis valorificarea cantitativă a rezul-

tatelor experimentale obţinute de R. Mond şi K. Amson, şi că valabilitatea acestor rezultate s-a confirmat prin reconsiderarea lor pe baza altor concepţii teoretice decît acelea ale autorilor menţionaţi care, la timpul lor, nu dispuneau pentru interpretare decît de teoria membranei.

Institutul de biochimie al Academiei Republicii Socialiste România
şi
Catedra de biochimie a Universităţii din Bucureşti

Prezentată la redacţie la 12 ianuarie 1966

BIBLIOGRAFIE

1. E. Macovschi, Materia vie şi distribuţia asimetrică a electroliţilor între protoplasmă şi lichidul interstiţial. (Bazele teoriei structurii şi comparaţia lor cu bazele teoriilor membranei şi sorbţiei). St. cerc. biochim., **9**, 4 (1965).
Living matter and the asymmetrical distribution of electrolytes between protoplasm and interstitial fluid. (Basis of the theory of structure as compared to the basis of membrane and sorption theories). Rev. roum. Biochem. *2*, 285 (1965).
2. R. Mond, K. Amson, Über die Ionenpermeabilität des quergestreiften Muskels. Pflüger's Archiv *220*, 1, 69 (1928).
3. L. J. Opit, J. S. Charnock, A molecular model for a sodium pump. Nature *208*, 471 (1965).
4. D. N. Nasonov, Mestnaia reacţia protoplasmî i rasprostraneaiusceesea vozbujdenie. Izd. Acad. Nauk SSSR, Moskva-Leningrad, 1959.
5. J. W. Woodbury, Membrana celulară. Gradienţii ionici şi de potenţial şi transportul activ, — în tratatul Th. C. Ruch şi J. F. Fulton „Fiziologie medicală şi biofizică", Ed. Medicală, Bucureşti, 1963.
The cell membrane : ionic and potential gradients and active transport. Chapter I of „Medical Physiology and Biophysics" by Th. C. Ruch and J. F. Fulton. — Saunders Company. Philadelphia and London, 1960.
6. A. Katz, Die mineralischen Bestandteile des Muskelfleisches. Arch. Ges. Physiol. *63*, 1 (1896).
7. C. Oppenheimer, Handbuch der Biochemie des Menschen und der Tiere. — Jena, Verlag G. Fischer, II-Auflage, Vol. IV, pg. 337—338.
8. W. Fenn, Electrolytes in muscle. Physiol. Rev. *16*, 450 (1936).
9. H. Arkin, R. R. Colton, An outline of statistical methods as applied to economics business education, social and physical sciences. Ed. 3-a, Bames and Noble Inc. N. Y., 1938.

ST. CERC. BIOCHIM., 9, 2, 139–146 (1966)

CERCETĂRI ASUPRA ROLULUI NUCLEULUI ÎN PROCESUL DE RESPIRAȚIE CELULARĂ *

I. MANTA, O. BÎRZU, ROZALIA POP și ILEANA BODEA

Rezumat. — S-a studiat efectul diferiților intermediari din ciclul acizilor tricarboxilici asupra consumului de oxigen al nucleilor izolați din ficatul de șobolan, utilizîndu-se pentru comparație mitocondriile și omogenatele. Substraturile NAD-dependente nu sînt oxidate în condițiile noastre de lucru, cu excepția citratului și glucozo-6-fosfatului. În schimb, nucleii de ficat prezintă o activitate citocromoxidazică și succinoxidazică comparabilă cu cea din mitocondrii. Oxidarea succinatului prezintă unele particularități în nucleu : inhibată de acidul oxalil-acetic, cianură (însă mai puțin decît în mitocondrii), neinhibată de amital, 2,4-DNP. Caracterul trecător al inhibiției cu acid oxalil-acetic, la concentrații mai mici decît 5 mM, indică posibilitatea îndepărtării sale din mediul de incubare printr-un mecanism diferit de cel întîlnit în mitocondrii. Fosforilarea oxidativă este prezentă în nuclei, însă valorile P/O sînt mult mai mici decît în mitocondrii, fapt ce lasă deschisă problema semnificației energetice a oxido-reducerilor din nuclei.

Studiile privitoare la rolul nucleului în furnizarea de energie, la „autonomia" sa energetică, au dovedit sinteza intranucleară de ATP [1—3]. Existența glicolizei în nucleu este un fapt admis astăzi de mulți autori [3—5]. Mai discutată rămîne însă posibilitatea eliberării de energie pe cale oxidativă. Primele cercetări în această direcție, efectuate de Shapiro [6], au arătat că celulele anucleate consumă mai mult oxigen decît cele intacte. Alte rezultate asemănătoare au impus concluzia că singura cale de sinteză intranucleară de ATP este cea anaerobiotică, glicoliza [6]. Cercetări publicate în ultimi ani contrazic această formulare, atribuind nucleului capacitatea de a oxida unele substrate [7], [8], natura și mecanismul unei asemenea căi oxidative fiind însă prea puțin cunoscute.

S-au semnalat în nuclei enzime ca citocromoxidaza și succinoxidaza în cantități mai reduse decît în mitocondrii, însă suficient de mari pentru a exclude posibilitatea unei contaminări a nucleilor cu mitocondrii [9], [10], precum și enzime de proveniență strict nucleară, ca NAD-fosforilaza, ARN-polimeraza [11]. Respirația nucleilor de ficat este slabă, dar măsurabilă, în condiții care exclud interferența cu oxidări nenucleare. Dispariția

* Lucrare publicată în Rev. roum. Biochim., 3, 1 (1966), în limba franceză.

^{32}P în fragmentele de nuclei de ficat în condiţii aerobe se intensifică în prezenţa florurii, este inhibată de cianură, oligomicină, antimicină A sau *2,4*-dinitrofenol (DNP). Fosfatul marcat apare însă în proporţie mai mică în adenin-nucleotide [12]. Este posibil ca enzimele nucleare de respiraţie să difere de cele mitocondriale, deoarece, în timp ce respiraţia şi fosforilarea nucleară sînt inhibate de ADN-ază, procesele similare din mitocondrii sînt neafectate. McEwen şi colab. [2] găsesc în nucleii de timus că inhibitorii glicolizei sau ai ciclului citric blochează respiraţia nucleară şi micşorează nivelul ATP. Betel şi Klouwan [13] atestă existenţa în nucleii izolaţi din timusul de şobolan a glicolizei, a şuntului pentozo-fosfatic, a ciclului tricarboxilic şi a oxidării fosforilante. De asemenea nucleul este sediul unei activităţi ATP-azice puternice [9].

În lucrarea de faţă am urmărit modul de oxidare a unor substraturi din metabolismul intermediar de către nucleii de ficat de şobolan, cu încercarea de a stabili asemănările şi deosebirile între oxidoreducerea nucleară şi cea mitocondrială.

MATERIAL ŞI METODE

Experienţele au fost efectuate pe nuclei izolaţi din ficat de şobolan. Animalele aveau greutatea cuprinsă între 175 şi 225 g. Unele experienţe au fost efectuate concomitent pe nuclei, mitocondrii sau omogenate, pentru a avea criterii directe de comparaţie.

Separarea nucleilor s-a făcut după Hogeboom [14]. Toate operaţiile descrise au fost efectuate la 0—4°C. După deschiderea abdomenului şi a cutiei toracice, la animale în stare de narcoză cu eter, se perfuzează ficatul cu NaCl 0,154 M, apoi cu zaharoză 0,25 M, care conţine $CaCl_2$ 1,8 mM. După izolare, ficatul a 2—3 animale se omogenizează în zaharoză 0,25 M conţinînd $CaCl_2$ 1,8 mM şi se obţine o suspensie 10%. Omogenatul se filtrează prin tifon pentru îndepărtarea ţesutului conjunctiv şi a detritusurilor celulare. O parte din omogenat se păstrează pentru unele determinări. Peste restul de omogenat (150 ml) se adaugă 300 ml de zaharoză 0,34 M cu un conţinut în $CaCl_2$ de 0,18 mM, în aşa fel încît cele două soluţii să rămînă stratificate. Amestecul se centrifughează 10 min la 600 *g*. Supernatantul se îndepărtează, iar sedimentul se reomogenizează cu 75 ml de zaharoză 0,25 M cu $CaCl_2$ 0,18 mM. Se adaugă ca mai sus 150 ml de zaharoză 0,34 M cu $CaCl_2$ 0,18 mM. Amestecul se recentrifughează la 600 *g* timp de 10 min. După repetarea operaţiei, sedimentul nuclear se resuspendă în 15 ml de zaharoză 0,25 M.

Separarea mitocondriilor s-a făcut după metoda Schneider [15]. Ficatul (neperfuzat) se omogenizează în zaharoză 0,25 M. Se centrifughează omogenatul timp de 10 min la 600 *g* pentru îndepărtarea nucleilor. Supernatantul rezultat se centrifughează timp de 10 min la 5 000 g. Sedimentul mitocondrial se reia în zaharoză 0,25 M şi se recentrifughează timp de 10 min la 9 600 *g*, operaţie ce se repetă. Final, sedimentul mitocondrial se resuspendă în zaharoză 0,25 M, astfel ca la 1 ml de suspensie să corespundă 0,5 g de ţesut iniţial.

Consumul de oxigen al nucleilor, omogenatelor şi mitocondriilor s-a determinat manometric. Mediul de incubare conţine 0,5—1 ml de suspensie de nuclei sau 0,5 ml de suspensie de mitocondrii sau 1 ml de omogenat 10%, tampon Tris pH 7,4 10 mM, tampon fosfat pH 7,4 10 mM, $MgCl_2$ 1 mM, NaF 2 mM, ATP 0,5 mM, ADP 0,5 mM, KCl 50 mM, EDTA 2 mM, substrat (acetat, lactat, piruvat, alfa-cetoglutarat, succinat, glucozo-*6*-fosfat, fumarat,

$NADH_2$) 10 mM. În diferite variante am urmărit efectul amitalului (1—8 mM), NaCN (0,5—5 mM), 2,4-DNP (0,02—0,10 mM), acidului oxalilacetic (2,5—10 mM) asupra consumului de oxigen al fracțiunilor studiate. S-a lucrat la temperatura de 35°C, durată experiențelor fiind de 60 min.

Eliberarea de CO_2 s-a măsurat manometric, prin metoda indirectă, utilizîndu-se două probe în paralel, care se deosebesc numai prin faptul că una are KOH în cupa centrală, iar cealaltă este lipsită de KOH.

Determinarea activității citocromoxidazei s-a făcut după Griffits și Wahrton [16]. Mediul de reacție conține tampon fosfat pH 7,4 20 mM, ascorbat pH 6,6 20 mM, citocrom *c* 0,1 mM, 0,02 ml de suspensie de mitocondrii sau 1 ml de suspensie de nuclei. Volum final, 2 ml; temperatura de lucru, 35°C; durata experienței, între 30 și 60 min.

Citul de fosforilare s-a determinat din valorile consumului de oxigen măsurate manometric și cele privind esterificarea fosfatului, în prezența hexokinazei și a glucozei ca acceptor final de fosfat. Mediul de reacție este același ca cel indicat pentru consumul de oxigen. Se lucrează cu succinat ca substrat (15 mM). În brațul lateral al vasului Warburg se pipetează 0,2 ml de glucoză 0,56 M și 0,1 ml de soluție de hexokinază 1% (preparat comercial purificat). Volum final, 2 ml; temperatura de lucru, 35°C. După 10 min de termoechilibrare, se răstoarnă conținutul vasului lateral în vasul principal și se urmărește consumul de oxigen timp de 20 min, după care se introduce în vasul principal 1 ml de acid tricloracetic 20%. Din filtrat se dozează fosforul anorganic după metoda Lowry-Lòpez [17].

REZULTATE

În tabelul nr. 1 sînt prezentate rezultatele cu privire la consumul de oxigen al nucleilor, în prezența diferitelor substraturi, în comparație cu cel

Tabelul nr. 1

Consumul de oxigen al nucleilor, mitocondriilor și omogenatelor în prezența diferitelor substraturi

Mediul de incubare și condițiile de lucru sînt indicate în text. Rezultatele sînt exprimate în μ atomi de oxigen/oră/mg N-proteic (N-proteic s-a dozat prin metoda micro-Kjeldahl) pentru nuclei și mitocondrii. În cazul omogenatelor, rezultatele se raportează la 1 mg de reziduu sec

Substrat	Q_{O_2} nuclei	Q_{O_2} mitocondrii	Q_{O_2} mitocondrii/ Q_{O_2} nuclei	Q_{O_2} omogenat
fără	0,70±0,06*	0	0	0,34±0,08
acetat 10 mM	0,63±0,08	0	0	0,41±0,05
lactat 10 mM	0,83±0,18	3,18±0,25	3,8	0,58±0,06
piruvat 10 mM	0,75±0,12	18,25±4,32	24,3	1,09±0,14
alfa-cetoglutarat 10 mM	0,78±0,10	33,63±6,19	38,2	1,65±0,33
fumarat 10 mM	0,73±0,09	15,28±5,50	20,9	1,23±0,21
citrat 10 mM	1,23±0,30	29,92±8,12	24,3	1,79±0,32
glucozo-6-fosfat 10 mM	1,14±0,26	23,25±6,52	20,4	1,46±0,40
glucoză 10 mM	0,53±0,08	0	0	0,38±0,10
$NADH_2$ 10 mM	0,78±0,15	4,27±0,88	5,5	0,97±0,23
succinat** 15 mM	8,42±2,34	14,56±3,05	1,7	—
citocromoxidaza	9,80±2,73	84,68±13,10	8,6	—

* Deviația standard (s).
** Succinatul s-a incubat numai 20 min și rezultatele sînt raportate pentru acest interval.

al mitocondriilor şi omogenatelor. Substraturile NAD-dependente exercită un efect de stimulare a consumului de oxigen atît pe omogenate, cît şi pe mitocondrii (cu excepţia acetatului), rămînînd fără efect asupra consumului de oxigen al nucleilor. Numai citratul şi glucozo-*6*-fosfatul (ambele dependente de NADP) au un efect de stimulare a respiraţiei nucleilor. Succinatul este oxidat puternic atît de nuclei, cît şi de mitocondrii sau de omogenate. Activitatea citocromoxidazică a nucleilor de ficat este mai mică decît în mitocondrii, avînd totuşi acelaşi ordin de mărime. $NADH_2$ exogen este oxidat de omogenate, în proporţie mică de mitocondrii şi de loc de nuclei.

Efectul diferiţilor inhibitori asupra consumului de oxigen în prezenţa succinatului este prezentat în tabelul nr. 2. *2,4*-DNP nu influenţează în concentraţiile utilizate consumul de oxigen al omogenatelor sau nucleilor,

Tabelul nr. 2

Efectul cianurii, amitalului, 2,4-DNP asupra consumului de oxigen al nucleelor, în prezenţa succinatului, (20 mM), mitocondriilor şi omogenatelor

Condiţiile de lucru sînt expuse în text. Rezultatele sînt exprimate în µ atomi oxigen/oră/mg N-proteic (pentru nuclei şi mitocondrii), respectiv în µ atomi oxigen/oră/mg de reziduu sec (pentru omogenate)

Substanţe	Q_{O_2} nuclei	Q_{O_2} mitocondrii	Q_{O_2} omogenate
fără	22,3±6,5	36,2±7,5	2,71±0,44
NaCN 0,5 mM	18,7±3,2	25,3±3,4	2,48±0,32
NaCN 2,0 mM	10,2±2,6	8,1±2,6	2,01±0,28
NaCN 5,0 mM	3,6±1,4	0	0,44±0,21
amital 1 mM	24,3±5,7	39,5±6,2	2,60±0,52
amital 2 mM	21,7±6,2	30,2±4,9	2,98±0,44
amital 8 mM	20,1±4,7	21,4±5,1	2,88±0,66
2,4 DNP 0,02 mM	23,1±4,2	35,1±5,9	2,48±0,39
2,4 DNP 0,05 mM	19,7±3,8	31,2±6,6	3,24±0,48
2,4 DNP 0,10 mM	21,2±4,8	26,6±5,4	3,06±0,58

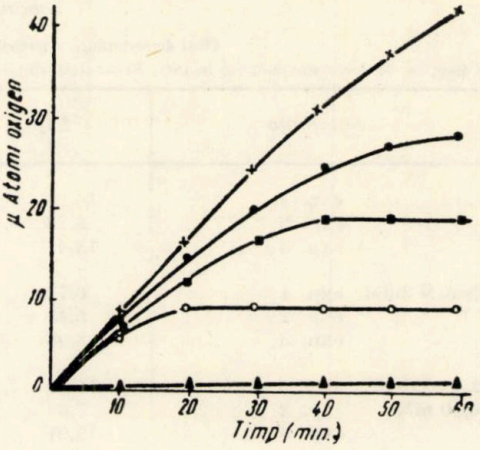
pe mitocondrii avînd un efect de inhibiţie la concentraţia de 0,1 mM. Cianura de sodiu exercită un efect diferit la concentraţii variabile asupra celor trei fracţiuni. Astfel, sensibilitatea nucleilor şi a omogenatelor la NaCN este mult mai redusă decît a mitocondriilor. Amitalul sodic, la concentraţia de 8 mM, exercită un efect inhibitor asupra oxidării succinatului de către mitocondrii, avînd un efect nul asupra nucleilor. Acidul oxalil-acetic este un inhibitor al consumului de oxigen al nucleilor şi mitocondriilor cu succinat. Intensitatea inhibiţiei depinde de concentraţia de acid oxalil-acetic şi succinat. La concentraţii de acid oxalil-acetic mai mari de 10 mM, efectul inhibitor este puternic şi constant, la concentraţii mai mici însă efectul inhibitor este trecător (durează 20–40 min), pentru ca apoi oxidarea succinatului să atingă valorile constatate la probele incubate fără acid oxalil-acetic (fig. 1 *a*, 1 *b*, 1 *c*). Inhibiţia oxidării succinatului de către acidul oxalil-acetic nu este suprimată de citrat, piruvat, alfa-cetoglutarat ci numai în prezenţa acidului glutamic. Pe omogenate, acidul oxalil-acetic exercită un efect de stimulare însemnată a respiraţiei.

Fig. 1. — Influența acidului oxalil-acetic asupra oxidării succinatului de către nucleii și omogenatele de ficat

Mediul de incubare și condițiile de lucru sînt indicate în text. S-a lucrat cu 0,5 ml de suspensie de nuclei (1,75 mg N-proteic) — fig. 1*a* și 1 *b* — și, respectiv, cu 1 ml de omogenat 10% (19,7 mg de reziduu sec) — fig. 1*c*.

Fig. 1 *a*

× succinat 30 mM
● succinat 15 mM
■ succinat 10 mM
○ succinat 5 mM
▲ ac. oxalil-acetic 10 mM (μ moli CO_2 eliberat)



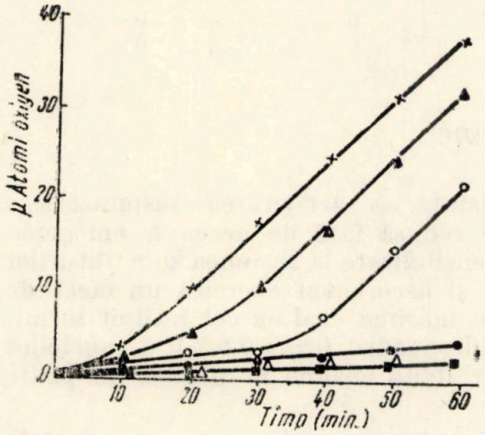


Fig. 1 *b*

× succinat 30 mM + ac. oxalil-acetic 10 mM + ac. glutamic 15 mM
▲ succinat 30 mM + ac. oxalil-acetic 2,5 mM
○ succinat 30 mM + ac. oxalil-acetic 5 mM
● succinat 10 mM + ac. oxalil-acetic 2,5 mM
■ succinat 5 mM + ac. oxalil-acetic 1,25 mM
△ succinat 30 mM + ac. oxalil-acetic 10 mM

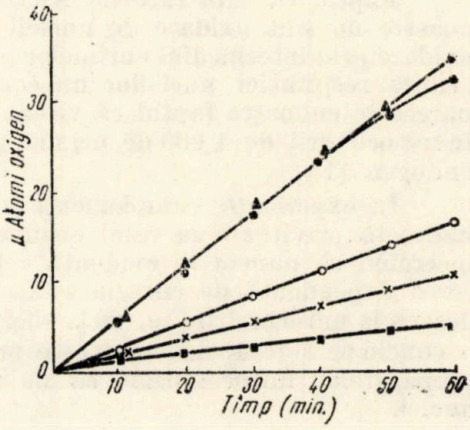


Fig. 1 *c*

▲ succinat 20 mM + ac. oxalil-acetic 10 mM
● succinat 20 mM
○ ac. oxalil-acetic 10 mM
× ac. oxalil-acetic 10 mM (μ moli CO_2 eliberat)
■ fără substrat

Fosforilarea oxidativă a ADP este manifestă în nucleu, deşi valorile cîtului de fosforilare sînt mult mai mici (P/O = 0,3). *2,4*-DNP împiedică folosirea oxidativă a ADP (tabelul nr. 3).

Tabelul nr. 3

Citul de fosforilare a nucleilor în prezenţa succinatului

Condiţiile de lucru sînt indicate în text. Rezultatele sînt exprimate în μ atomi, respectiv μ moli P_i /20 min/mg N-proteic

Substanţa		ΔQ_{O_2}	ΔP	P/O
fără	exp. 1	10,27	3,21	0,31
	exp. 2	8,28	2,07	0,25
	exp. 3	13,41	3,55	0,27
NaCN 2mM	exp. 1	6,72	0,68	0,10
	exp. 2	5,43	0	0
	exp. 3	8,08	0,46	0,06
2,4—DNP 0,10 mM	exp. 1	11,37	0	0
	exp. 2	7,83	0	0
	exp. 3	12,91	0	0

DISCUŢII

Din datele prezentate se constată că activitatea respiratorie a nucleilor, deşi prezentă, este foarte redusă faţă de aceea a omogenatelor sau mitocondriilor şi lipsită de sensibilitate la acţiunea substraturilor NAD-dependente. Numai succinatul şi ascorbatul exercită un efect de stimulare a respiraţiei la un ordin de mărime egal cu cel întîlnit în mitocondrii. Deşi contaminarea cu mitocondrii (cam 0,5%) a nucleilor este inevitabilă [14], existenţa celor două enzime în nucleu nu poate fi pusă la îndoială.

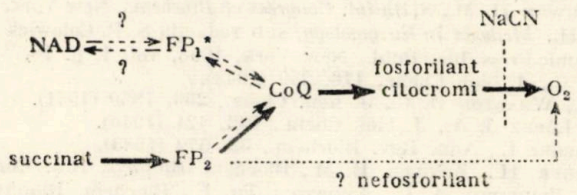
Faptul că substraturile NAD-dependente utilizate în experienţele noastre nu sînt oxidate de nucleii de ficat nu exclude posibilitatea de oxidare prin intermediul enzimelor piridinice. Nici lipsa de efect a $NADH_2$ asupra respiraţiei nucleilor nu constituie o dovadă în acest sens, deoarece se cunoaşte faptul că viteza de oxidare a $NADH_2$ exogen este şi în mitocondrii de 1 000 de ori mai mică decît viteza de oxidare a $NADH_2$ endogen [18].

În experienţe complementare am încercat să aducem o dovadă indirectă privitoare la rolul enzimelor piridinice în respiraţia nucleară, încercînd să punem în evidenţă calea inversă de oxidare, anume reducerea dependentă de energie a NAD în prezenţa succinatului, fenomen descris la mitocondrii [19, 20]. Nici aici rezultatele noastre nu ne permit o concluzie sigură, deoarece este probabil ca şi condiţiile de incubare a preparatelor mitocondriale să nu fie propice fenomenelor studiate pe nuclei.

Faptele prezentate ridică deci două probleme : sau substraturile NAD-dependente pot fi oxidate de enzimele de respirație din nuclei, însă diferă de cele caracteristice mitocondriilor, sau calea piridinică de oxidare joacă un rol secundar în nuclei.

Oxidarea succinatului în nuclei prezintă asemănări, dar și deosebiri față de oxidarea mitocondrială. Inhibiția cu acid oxalil-acetic este de natură competitivă (depinde în anumite limite de raportul concentrațiilor succinatului și acidului oxalil-acetic). Îndepărtarea acidului oxalil-acetic prin transaminare cu acid glutamic elimină complet efectul inhibitor al acestuia. Spre deosebire de mitocondrii, intermediarii ciclului acizilor tricarboxilici nu pot preveni inhibiția oxidării succinatului de către acidul oxalil-acetic. O particularitate interesantă a efectului acidului oxalil-acetic asupra respirației nucleilor cu succinat este faptul că la concentrații mai mici ale primului (1,25—5 mM) efectul inhibitor este temporar. Deoarece nucleii, ca și mitocondriile, nu pot decarboxila acidul oxalil-acetic (fig. 1 *a*), spre deosebire de omogenate (fig. 1 *c*), presupunem că are loc îndepărtarea acestui inhibitor din sistem printr-un mecanism care nu depinde de ATP, amital, *2,4*-DNP. În privința efectului cianurii, sensibilitatea mai mică a sistemelor de oxidare a succinatului din nuclei indică posibilitatea unei căi secundare de oxidare, nefosforilante, între flavine și oxigen. Acest fapt este sugerat și de lipsa de efect a amitalului și *2,4*-DNP asupra oxidării succinatului, de valorile mici ale cîtului de fosforilare și de efectul cianurii asupra P/O din nuclei.

Din datele prezentate pare posibilă următoarea cale de transport al electronilor în nucleul celulei hepatice, în comparație cu schemele similare elaborate pentru mitocondrii :



Cît despre semnificația energetică a oxidoreducerilor din nucleu și a raporturilor cu glicoliza, aceasta rămîne încă susceptibilă de discuții.

CONCLUZII

1. Nucleii izolați din ficatul de șobolan nu oxidează substraturile NAD-dependente din ciclul acizilor tricarboxilici, fapt ce nu poate exclude însă existența căii piridinice de oxidare în nucleu.

2. Oxidarea succinatului, ca și activitatea citocromoxidazică în nucleu, are același ordin de mărime ca și procesele similare din mito-

* FP_1 și FP_2 sînt flavoproteinele 1 și 2.

condrii. Oxidarea succinatului prezintă unele particularităţi care sugerează posibilitatea unei căi secundare de oxidare între flavine şi oxigen, insensibilă la acţiunea cianurii, amitalului sau *2,4*-DNP.

3. Efectul inhibitor al acidului oxalil-acetic asupra oxidării succinatului în nuclei este de natură competitivă, caracterul trecător al inhibiţiei la concentraţii mici de acid oxalil-acetic indicînd posibilitatea îndepărtării lui din sistem printr-un mecanism diferit de cel din mitocondrii.

4. Fosforilarea oxidativă este prezentă în nucleii de ficat, valorile P/O fiind însă mult mai mici decît cele proprii mitocondriilor.

Catedra de biochimie, I.M.F. Cluj

Prezentată la redacţie la 26 noiembrie 1965

BIBLIOGRAFIE

1. Mc Ewen B. S., Allfrey V. G., Mirsky A. E., J. biol. Chem., **238**, 758 (1963).
2. Mc Ewen B. S., Allfrey V. G., Mirsky A. E., J. biol. Chem., **238**, 2571 (1963).
3. Mc Ewen B. S., Allfrey V. G., Mirsky A. E., J. biol. Chem., **238** 2579 (1963).
4. Ord M. G., Stoken L. A., Biochem. J., **84**, 593 (1962).
5. Le Page C. A., Schneider W. C., J. biol. Chem., **176**, 1021 (1948).
6. Brachet J., *Biohimiceskaia ţitologhia*, Izd. Inostranoi Literaturî, Moscova, 1960, p. 328.
7. Huggins A. K., Rowland G. F., Biochem. J., **84**, 67 P (1962).
8. Betel I., Klouwen H. M., Biochem. biophys. acta, **76**, 327 (1963).
9. Rees K. R., Rowland G. F., Biochem. J., **78**, 89 (1961).
10. Boodyn D. B., Biochem. J., **84**, 3 P (1962).
11. Widnell C. C., Biochem. J., **89**, 11 P (1963).
12. Penniall R., Saunders J. P., Liu S. M., Griffin J. B., *Sixth int. Congr. of Biochem.*, New York, 1964, Abstracts X.
13. Betel I., Klouwen H. M., *Sixth int. Congress of Biochem.*, New York, 1964, Abstracts X.
14. Hogeboom G. H., *Methods in Enzymology*, sub redacţia S. P. Colowick şi N. O. Kaplan, Academic Press Inc. Publ., New York, 1955, vol. I, p. 16.
15. Schneider W. C., J. biol. Chem., **176**, 259 (1948).
16. Griffits D. E., Wharton D. C., J. biol. Chem., **236**, 1850 (1961).
17. Lowry O. H., Lòpez J. A., J. biol. Chem., **162**, 421 (1946).
18. Massey V., Veeger C., Ann. Rev. Biochem., **32**, 579 (1963).
19. Löw H., Krueger H., Ziegler D. M., Biochem. Biophys. Res. Comm., **2**, 71 (1960).
20. Sanadi D. R., Fluharhy A. L., Andreoli Th. E., Biochem. Biophys. Res. Comm., **8**, 200 (1962).
21. Klingenberg M., Schollmeyer P., Biochem. Biophys. Res. Comm., **4**, 38 (1961).

ST. CERC. BIOCHIM., 9, 2, 147–166 (1966)

RELAŢII ÎNTRE ACTIVITATEA ENZIMATICĂ LA NIVEL SUBCELULAR ŞI DETERGENŢI, MACROANIONI ŞI SOLVENŢI NEAPOŞI*

S. COMOROŞAN, S. SOLOMON, S. VIERU şi M. STĂNESCU

577.15

Rezumat. — Au fost investigate efectele solvenţilor neapoşi, macroanionilor şi detergenţilor ionici şi neionici asupra activităţii enzimatice intramitocondriale şi intralizozomale din ficatul de şobolan. De asemenea au fost înregistrate swellingul mitocondrial şi consumul de oxigen. Toţi agenţii studiaţi modifică swellingul mitocondrial. Enzimele lizozomale sînt inhibate în mediul de reacţie cu dioxan, formamidă şi etilen-glicol. Macroionii de tip heparină, PVP şi dextrină influenţează apreciabil activitatea acestora şi spectrele lor de absorbţie în u.v. Dehidrogenazele intramitocondriale nu sînt sensibile la efectul macroanionilor, dar sînt influenţate de unii solvenţi neapoşi şi de detergenţi. Activitatea lactic-dehidrogenazei intramitocondriale a fost stimulată în aproape toate experienţele. Oxidarea succinatului şi a glutamatului de către mitocondrii este inhibată sub acţiunea tuturor agenţilor folosiţi, cu excepţia etilen-glicolului şi a linoleatului de sodiu. Se discută mecanismul de acţiune al swellingului mitocondrial, ca şi modalităţile generale de acţiune ale solvenţilor neapoşi întrebuinţaţi, asupra protein-enzimelor native organizate la nivelul particulelor subcelulare.

Se emite o ipoteză asupra posibilităţilor de localizare a centrilor activi în enzimele intralizozomale şi asupra poziţiei speciale a moleculei de LDH în interiorul structurii intramitocondriale.

Rezultate privind structura cuaternară a proteinelor, în sensul noţiunii introduse de Bernal [1], au fost obţinute prin studiul interferenţei soluţiilor de proteine în solvenţi neapoşi, *in vitro* [2], [3].

Acţiunea diferiţilor agenţi asupra grupărilor hidrofile şi hidrofobe ale proteinelor la nivelul subcelular, unde abundă componente lipidice complexe, se poate prezenta sub diverse aspecte. Astfel, Jurtschuk [4] arată că dehidrogenaza butirică, extrasă în mediu apos, necesită pentru activitatea ei fiziologică toţi cofactorii de natură lipidică prezenţi în mod normal în interiorul mitocondriei. În această privinţă, lucrarea de faţă îşi propune investigarea influenţei exercitate de o serie largă de solvenţi neapoşi asupra activităţii enzimatice a particulelor subcelulare mi-

* Lucrare publicată în Rev. roum. Biochim., 3, 1 (1966) în limba engleză.

tocondriale și lizozomale. Rezultatele obținute au fost interpretate în lumina unor cercetări similare efectuate pe proteine pure, *in vitro* [5], [6].

Am încercat în acest mod să desprindem unele concluzii cu privire la caracteristicile funcționale legate de structura cuaternară a componentei enzimatice apoproteice din interiorul particulei subcelulare.

Se știe că la acest nivel, activitatea enzimatică depinde de integritatea componentelor lipoproteice ale membranelor celulare. Datorită acestui fapt, am extins investigațiile noastre asupra unor agenți cu acțiune directă pe aceste structuri. Au fost studiați o serie de detergenți ionici și neionici și o serie de macroanioni. Rezultatele privitoare la activitatea enzimelor intralizozomale au fost completate cu spectrele de absorbție în u.v. ale RN-azei și DN-azei în prezența dioxanului, formamidei, etilen-glicolului, heparinei și P.V.P.-ului.

MATERIALE ȘI METODĂ

Pentru experiențe am folosit șobolani Albino masculi, adulți, cu greutatea medie de 200 g.

Au fost întrebuințate următoarele chimicale speciale: RN-ază EC (3.1.4.5) crist. 5x, DN-ază EC (2.7.7.16) crist. 2x, NAD*, NADP și acid linoleic NBC, Tween 80 și dodecil sulfat de sodiu Serva Heidelberg, dezoxicolat de sodiu BDH, Lubrol MOA și Lissapol MX de la Imperial Chemicals Industries [7].

Ceilalți reactivi au fost de uz curent [8—10].

Determinările de activitate enzimatică, swelling mitocondrial și spectrele de absorbție în u.v. au fost efectuate cu spectrofotometre Beckman tip DU și B, în cuve de cuarț de 1 cm, la 25°C.

Produsele biologice au fost preparate după Schneider și Hogeboom. Puritatea fracțiunilor subcelulare a fost controlată prin determinarea distribuției enzimelor caracteristice fiecărei fracțiuni, conform datelor din literatură [8], [16].

Animalele au fost sacrificate prin decapitare și exsanguinare. Mitocondriile grele și lizozomii s-au obținut prin centrifugarea omogenatului de țesut hepatic 30% în sucroză 0,25 M, la 6 500 și respectiv 11 000 *g*.

Toate operațiile au fost efectuate la temperaturi între 0 și 4°C.

Determinarea activității enzimatice. Activitatea SDH a fost determinată cu ajutorul metodei lui Slater și Bonner [11], activitatea MDH și LDH după metoda lui Gallager [12], modificată de Scarfe și Alexander [13], iar a IDH după Wolfson [14]. Pentru determinarea activității GDH am folosit metoda lui De Duve, care asociază acțiunii detergentului cisteina, un binecunoscut inductor al swellingului mitocondrial. Acest mediu de reacție este raportat în experiențele noastre ca GDH—A. Pentru a marca însă eficiența agentului folosit, am determinat de asemenea activitatea GDH într-un mediu de reacție fără cisteină (raportat ca GDH—B). Activitatea transaminazelor intramitocondriale a fost evaluată după Bruyet

* Am folosit următoarele prescurtări: DOC = dezoxicolat de sodiu; Na DS = dodecil sulfat de sodiu; PVP = polivinil-pirolidonă; SDH = succinic-dehidrogenaza; IDH = izocitric-dehidrogenaza; MDH = malic-dehidrogenaza; LDH = lactic-dehidrogenaza; GDH = glutamic-dehidrogenaza; GPT = glutamic-piruvic-transaminaza; GOT = glutamic-oxalacetic-transaminaza.

[15], activitatea RN-azei și DN-azei lizozomale după De Duve [16], iar cea a fosfatazei acide cu ajutorul metodei clasice a lui Bodansky.

Swellingul mitocondrial a fost determinat după Lehninger [17]. Am folosit ca inductor de swelling L-cisteina. Am denumit acest mediu de reacție, în experiențele noastre, swelling—A. Pentru a scoate în evidență însă acțiunea exclusivă a agentului folosit de inducere a swellingului, am mai determinat swellingul mitocondrial într-un mediu de reacție fără cisteină și care a constat din : sucroză 0,33 M, agent inductor, suspensie mitocondrială și apă distilată, într-un volum final de 3,1 ml (swelling—B).

Oxidarea succinatului și glutamatului de către mitocondriile izolate din ficat de șobolan a fost determinată într-un aparat Warburg, pe o perioadă de 60 min la 30°C, cu timp de echilibrare a temperaturii de 15 min. Am folosit mediul de reacție al lui Rowand și Chaffee [18], înlocuind însă glicil-glicina cu Tris. Pentru fiecare experiență, am ajustat concentrația suspensiei mitocondriale la aceeași valoare, pe baza determinării absorbției la $\varepsilon_\lambda = 510$ mμ.

Proteinele au fost dozate după Lowry [19], folosind drept standard serum-albumina cristalizată de bou.

Efectul detergenților, solvenților neapoși și macroanionilor a fost evaluat prin urmărirea acțiunii lor asupra activității enzimatice, după incubarea suspensiilor mitocondriale sau lizozomale cu agentul respectiv.

Pentru dehidrogenaze, perioada de incubare a fost de 30 min la 25°C, iar pentru transaminaze, fosfataza acidă și nucleaze 60 min la 37°C. În cazul SDH am determinat activitatea enzimatică într-un mediu de reacție conținînd agentul respectiv, fără incubație prealabilă (SDH—N), precum și după o incubație de 30 min la 25°C (SDH—B). Această dublă evaluare a fost efectuată în scopul de a elimina orice eroare care ar fi survenit prin modificarea swellingului mitocondrial în prezența agenților investigați.

În determinările consumului de oxigen nu am folosit perioade de incubație prealabilă cu agentul investigat.

REZULTATE

Rezultatele noastre sînt reprezentate în tabelele nr. 1—10 (valoarea medie a 5 experiențe) și în figurile 1—6. Tabelele nr. 1 și 2 prezintă rezultatele privitoare la swellingul mitocondrial indus simultan de către agentul investigat plus cisteină, ca și la cel indus în urma acțiunii exclusive a agentului.

Solvenții neapoși bazici sau puternic acizi (fig. 1—3) nu sînt indicați pentru experiențele de swelling, întrucît ei produc o clarificare instantanee a suspensiei mitocondriale.

Acțiunea macroanionilor se exercită în toate cazurile în același sens, însă cu intensități diferite. Toți induc swelling mitocondrial în mediu de sucroză și modifică swellingul indus de cisteină. Detergenții neionici măresc swellingul mitocondrial, cu excepția lissapolului, care, dimpotrivă, generează o contracție mitocondrială marcată. Dintre detergenții ionici, acidul linoleic induce swelling în mediul de sucroză, în timp ce acțiunea NaDS și DOC nu poate fi urmărită în condițiile noastre experimentale, datorită clarificării instananee a suspensiei mitocondriale.

Tabelul nr. 1

Efectul solvenților neapoși și al macroanionilor asupra swellingului mitocondrial

Mediul de reacție A : sucroză 0,66 mmoli, L-cisteină 3,7 µmoli, solvent neapos (sau macroanion) 0,5 ml, suspensie de mitocondrii 0,1 ml, într-un volum final de 3,1 ml.
Mediul de reacție B : sucroză 0,66 mmoli, solvent neapos (sau macroanion) 0,5 ml, suspensie de mitocondrii 0,1 ml, într-un volum final de 3,1 ml.
O unitate swelling : $\Delta A_{520} = 0{,}001$/mg de proteină mitocondrială/min.

Swellingul mitocondrial	Solvenți neapoși					Macroanioni					
	Martor	Formamidă	Dioxan	Etilenglicol	Acid formic	Heparină		PVP		Dextrină	
Swelling A	54	35	26	42	0	15	10	76	30	87	72
Swelling B	0	11	7,5	5	0	12,5	10	5	5	17,5	12
Agent/mg* de proteină în mediul de reacție		0,2	0,2	0,2	0,2	1	20	1	20	1	20

* Pentru solvenți neapoși : ml de agent/mg de proteină mitocondrială ; pentru macroanioni : mg de agent/mg de proteină mitocondrială.

Tabelul nr. 2

Efectul detergenților asupra swellingului mitocondrial

(Condițiile experimentale au fost descrise la tabelul nr. 1).

Swelling mitocondrial	Detergenți																			
	Neionici												Ionici							
	Lissapol				Lubrol				Tween				Linoleat				DOC				NaDS			
Swelling A	10	5	2,5	2,5	62	65	76	98	182	211	283	245	43	43	44	45	—	—	—	—	—	—	—	—
Swelling B	0	0	0	0	12,5	14,5	18	27	5	0	0	5	2,5	5	12,5	17,5	—	—	—	—	—	—	—	—
Agent/mg* de proteină în mediul de reacție	1,5	3	6	12	1,5	3	6	12	1,5	3	6	12	1,5	3	6	12	1,5	3	6	12	1,5	3	6	12

* Pentru solvenții neapoși : absență de agent/mg de proteină mitocondrială ; pentru macroanioni ; mg de agent/mg de proteină mitocondrială.

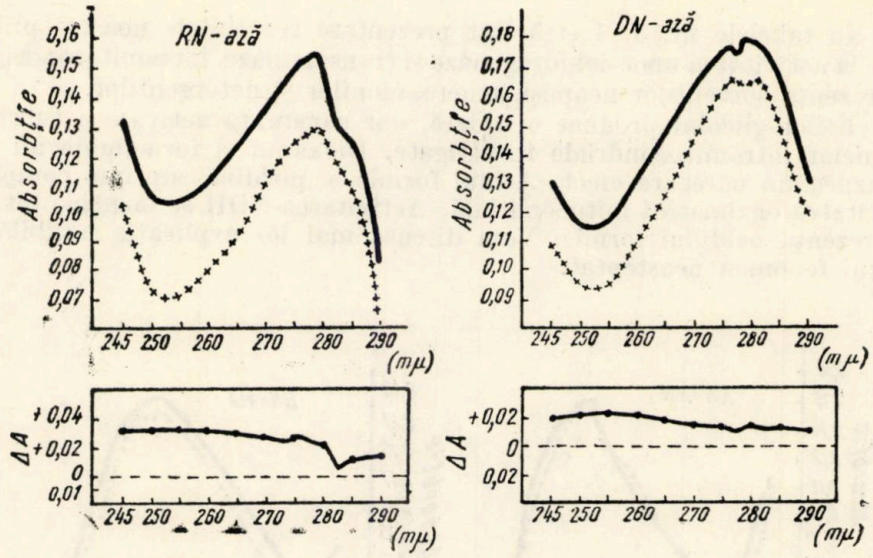


Fig. 1. — Efectul dioxanului asupra spectrului de adsorbție în ultraviolet al RN-azei și DN-azei.

+++ enzimă purificată 0,2% în 0,025 M de tampon acetat (pH 5).

——— enzimă purificată în prezența 0,2 ml de dioxan/mg de proteină-enzimă. Perioada de incubare: 1 oră la 37°C.

●—●—● Spectrul de absorbție diferențial al enzimei în prezența dioxanului. Perioada de incubare: 1 oră la 37°C. Soluție de referire: 0,2% enzimă purificată în 0,025 M de tampon acetat (pH 5).

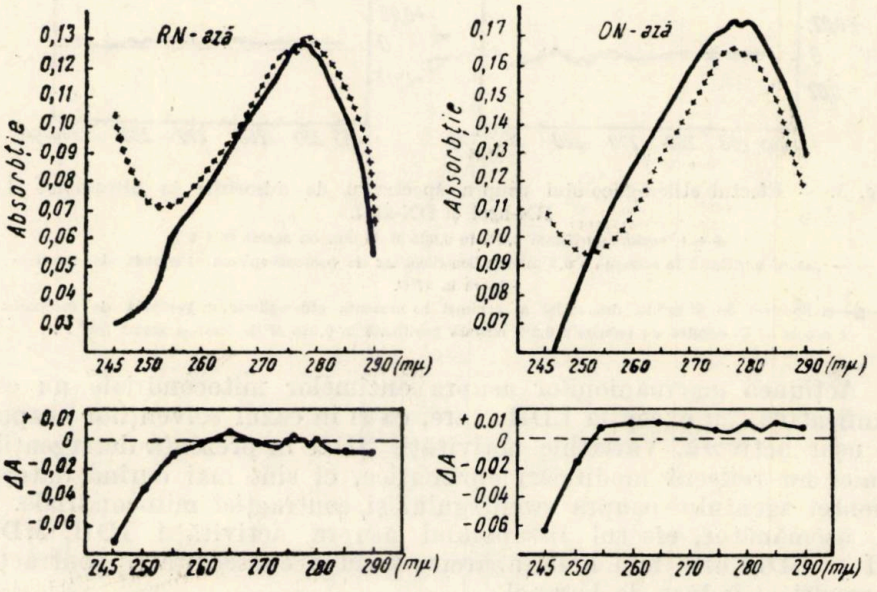


Fig. 2. — Efectul formamidei asupra spectrului de adsorbție în ultraviolet al RN-azei și DN-azei.

+++ enzimă purificată 0,2% în 0,025 M de tampon acetat (pH 5).

——— enzimă purificată în prezența a 0,2 ml de formamidă/mg de proteină-enzimă. Perioada de incubare: 1 oră la 37°C.

●—●—● Spectrul diferențial al enzimei în prezența formamidei. Perioada de incubare: 1 oră la 37°C. Soluție de referire: 0,2% în 0,025 M de tampon acetat (pH 5).

În tabelele nr. 3, 4 și 5 sînt prezentate rezultatele noastre privitoare la activitatea unor dehidrogenaze și transaminaze intramitocondriale în prezența solvenților neapoși, macroanionilor și detergenților.

Etilen-glicolul produce o ușoară, dar constantă activare a tuturor enzimelor intramitocondriale investigate. Dioxanul și formamida au de asemenea un oarecare efect. Acidul formic și piridina suprimă complet activitatea enzimatică mitocondrială. Activitatea SDH se menține totuși în prezența acidului formic. Vom discuta mai jos explicația posibilă a acestui fenomen neașteptat.

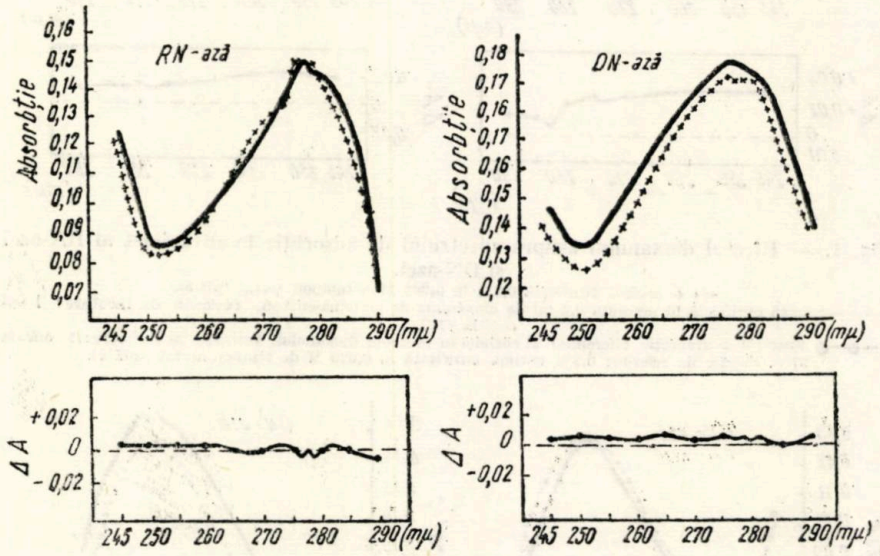


Fig. 3. — Efectul etilen-glicolului asupra spectrului de adsorbție în ultraviolet al RN-azei și DN-azei.

+ + + enzimă purificată 0,2% în 0,025 M de tampon acetat (pH 5).

——— enzimă purificată în prezența a 0,2 ml de etilen-glicol/mg de proteină-enzimă. Perioada de incubare: 1 oră la 37°C.

●—●—● Spectrul de absorbție diferențial al enzimei în prezența etilen-glicolului. Perioada de incubare: 1 oră la 37°C. Soluție de referire': 0,2% enzimă purificată în 0,025 M de tampon acetat (pH 5).

Acțiunea macroanionilor asupra enzimelor mitocondriale nu este semnificativă, cu excepția LDH, care, ca și în cazul solvenților neapoși, este ușor activată. Variațiile activității SDH în prezența detergenților neionici nu reflectă modificări enzimatice, ci sînt mai curînd datorite influenței agentului asupra swellingului și contracției mitocondriale. În mod asemănător, efectul lissapolului asupra activității IDH, MDH, LDH și GDH este mai mult aparent, fiind o consecință a contracției mitocondriale induse de lissapol.

Lubrolul produce o creștere ușoară a activității IDH și o scădere marcată a activității MDH, scădere proporțională cu concentrația deter-

Tabelul nr. 3

Efectul solvenților neapoși și al macroaninonilor asupra enzimelor mitocondriale

O unitate enzimatică pentru dehidrogenaze este exprimată prin: $\Delta A_{340} = 0{,}001$ /mg de proteină/min.
O unitate enzimatică pentru transaminaze este exprimată prin formarea a 0,06 µmoli de piruvat/mg de proteină/oră

Mediul de reacție	Solvenți neapoși					Macronioni					
	Martor	Formamidă	Dioxan	Etilenglicol	Acid formic	Heparină		PVP		Dextrină	
SDH Med. de reacție	70	75	55	82,5	70	70	72	70	71	77,5	77,5
SDH Med. de reacție B	27	20	10	20	14	25	20	26	24	24	25
IDH	50	70	39	64	0	—	61	—	45	—	80
MDH	35	40	20	40	0	35	35	36	32,5	36	30
LDH	60	90	60	70	0	80	82	80	75	95	100
GDH Med. de reacție A	10	5	—	20	0	10	7	6	12	0	7
GDH Med. de reacție B	0	2,5	0	10	0	0	0	0	1	0	7
GPT	10	3	7	12	0	9,1	3,8	12	13	9,8	9,1
GOT	22,8	21,9	—	30	0	21	21	25	29	22,8	21
Agent/mg de proteină* în mediul de reacție		0,04	0,04	0,04	0,04	0,2	4	0,2	4	0,2	4

* Pentru solvenți neapoși: ml de agent/mg de proteină mitocondrială; pentru macroanioni: mg de agent/mg de proteină mitocondrială.

Tabelul nr. 4

Efectul detergenților neionici asupra enzimelor mitocondriale

O unitate enzimatică pentru dehidrogenaze este exprimată prin: $\Delta A_{340} = 0{,}001$ /mg de proteină/min.
O unitate enzimatică pentru transaminaze este exprimată prin formarea a 0,06 µmoli de piruvat/mg de proteină/oră

Mediul de reacție	Martor	Detergenți neionici											
		Lissapol				Lubrol				Tween			
SDH Med. de reacție A	70	25	0	12	10	105	—	—	95	115	—	—	120
SDH Med. de reacție B	27	15	5	2,5	0	15	25	30	38	22,5	21,5	21,5	21,5
IDH	50	95	125	205	260	45	53	60	70	60	67	70	69
MDH	35	70	95	170	200	40	30	22	12	30	35	27,5	30
LDH	60	75	80	160	70	71	75	68	57	65	68	70	55
GDH Med. de reacție A	10	60	105	211	170	15	5	5	0	5	10	10	12
GDH Med. de reacție B	0	45	60	140	65	10	5	0	—	0	0	1	2,5
GPT	10	—	—	—	—	—	—	—	—	5,3	6	6,8	7,6
GOT	22,8	—	—	—	—	—	—	—	—	18	22,8	17	23,8
Agent/mg de proteină în mediul de reacție*		0,3	0,6	1,2	2,4	0,3	0,6	1,2	2,4	0,3	0,6	1,2	2,4

* mg de detergent/mg de proteină mitocondrială.

Tabelul nr. 5

Efectul detergenților ionici asupra enzimelor mitocondriale

1 UE pentru dehidrogenaze este exprimată prin $\Delta A_{340} = 0{,}001$/mg de proteină /min.
I UE pentru transaminaze este exprimată prin formarea a 0,06 μ moli de piruvat/mg de proteină/oră

Mediul de reacție	Martor	Detergenți ionici											
		Linoleat				Doc				Na DS			
SDH Med. de reacție A	70	90	90	87	85	—	—	—	—	—	—	—	—
SDH Med. de reacție B	27	32,5	30	29	27,5	—	—	—	—	—	—	—	—
IDH	50	67,5	75	78	—	33	35	37	40	15	—	—	10
MDH	35	40	37	35	29	30	35	35	42	35	22	15	5
LDH	60	70	70	65	47	60	70	80	72	5	2,5	0	0
GDH Med. de reacție A	10	10	15	15	10	15	10	6	2,5	2,5	0	0	0
GDH Med. de reacție B	0	7,5	5	5	7	5	—	—	0	0	0	0	—
GPT	10	10	10,6	5,3	11,8	3	3,1	3,4	3	0,8	—	—	1,6
GOT	22,8	20	9,8	16,7	25	24	29,4	37	24,9	8	4,4	9,8	3
Agent/mg de proteină în mediul de reacție*		0,3	0,6	1,2	2,4	0,3	0,6	1,2	2,4	0,3	0,6	1,2	2,4

* mg de detergent/mg de proteină mitocondrială.

Tabelul nr. 6

Efectul solvenţilor neapoşi şi al macroanionilor asupra enzimelor lizozomale

Fosfataza acidă este exprimată în unităţi Bodansky. O unitate enzimatică pentru RN-ază şi DN-ază este exprimată prin formarea a 1 µmol de oligonucleotide/mg de proteină/oră

Enzima	Solvenţi neapoşi								Macroanioni						
	Martor	Formamidă		Dioxan		Etilen-glicol		Acid formic	Piridină	Heparină		PVP		Dextrină	
Fosfatază acidă	2,6	2,9	0,3	2,9	0,6	6,3	3	0	0	—	—	—	—	3,4	3,5
RN-ază	0,42	0	0,25	0,41	0,33	0,42	0,38	0,13	0	0,66	0,05	0,63	0,62	0,44	—
DN-ază	0,037	0,3	0,4	0,2	0	0,03	0,03	0,01	0	0,021	0,04	0,02	0,007	0	0,02
Agent/mg de proteină lizozomală *		0,06	0,19	0,06	0,19	0,06	0,19	0,06	0,06	3,2	6,4	3,2	6,4	3,2	6,4

* Pentru solvenţi neapoşi : ml de agent/mg de proteină lizozomală; pentru macroanioni : mg de agent/mg de proteină lizozomală.

Tabelul nr. 7

Efectul detergenţilor ionici asupra enzimelor lizozomale

Fosfataza acidă este exprimată în unităţi Bodansky. O unitate enzimatică pentru RN-ază şi DN-ază este exprimată prin formarea a 1 µmol de oligonucleotid/mg de proteină/oră

Enzima	Martor	Detergenţi ionici											
		Linoleat				DOC				NaDS			
Fosfatază acidă	2,6	3,3	3,45	3,2	3,8	3,2	3	3	3,2	0	0	0	0
RN-ază	0,42	0,42	0,39	0,46	0,43	0,43	0,41	0,41	0,25	—	0,11	—	0
DN-ază	0,037	0,034	0,027	0,041	0,025	0,005	0,001	0,014	0,043	—	—	—	0,04
Agent/mg de proteină lizozomală *		0,48	0,96	1,92	3,84	0,48	0,96	1,92	3,84	0,48	0,96	1,92	3,84

* mg de detergent/mg de proteină lizozomală.

gentului în mediul de reacție. Atît lissapolul, cît și lubrolul, sînt neindicați pentru experiențe pe transaminaze, întrucît produc reacții secundare de precipitare. Influența detergenților ionici asupra enzimelor mitocondriale este variată. DOC inhibă activitatea IDH și GPT și stimulează activitatea GOT și LDH. NaDS produce o inhibare completă a activității enzimatice mitocondriale, în concordanță și cu rezultatele lui Hersch [20]. DOC și NaDS induc o clarificare instantanee a mediului de reacție în cazul SDH.

Tabelele nr. 6 și 7 prezintă activitatea enzimelor lizozomale. În experiențele noastre, solvenții neapoși sînt efectivi numai la concentrații mari. Acțiunea macroanionilor asupra RN-azei și DN-azei ridică unele aspecte particulare. Heparina produce o inhibare netă a activității RN-azei, iar la concentrații mari o ușoară activare a DN-azei. Această acțiune antagonică se manifestă și în cazul spectrelor de absorbție în u.v. (fig. 4). Dimpotrivă, P.V.P. stimulează activitatea RN-azei și o inhibă pe cea a DN-azei, ceea ce apare clar și din spectrele diferențiale de absorbție în u.v. (fig. 5). Detergenții neionici nu sînt indicați pentru studiul enzimelor lizozomale. Ei induc reacții secundare, care opacifiază mediul de reacție. Dintre detergenții ionici, NaDS exercită o influență tipică de denaturare a moleculei de protein-enzimă, cu excepția DN-azei, care este rezistentă la acțiunea acestui agent.

Tabelele nr. 8—10 reprezintă consumul de oxigen al mitocondriilor, cu substrat glutamat și succinat, în prezența reactivilor menționați. Respirația cu glutamat este inhibată de dioxan, formamidă, heparină, tween 80, lissapol, NaDS și DOC. Etilen-glicolul și linoleatul nu produc modificări. Dioxanul, formamida, acidul formic și NaDS produc o inhibiție asemănătoare și asupra activității GDH intramitocondriale. În respirația cu succinat, linoleatul și lubrolul apar ca inhibitori. Din punctul de vedere al legăturii dintre acțiunea agentului asupra enzimei mitocondriale și respirație pot fi relevate unele rezultate. Astfel, dioxanul și NaDS acționează în același mod, prin inhibarea respirației cu alterarea activității enzimatice. Acidul formic, formamida, dextranul, heparina, tween 80 și linoleatul acționează în sens opus, prin inhibarea respirației fără modificarea activității SDH intramitocondriale.

Experiențele descrise mai sus s-au referit la activitatea enzimelor în complexul proteic al particulei subcelulare.

Pentru a obține date în plus, am efectuat o serie de experiențe pe enzime pure, cristalizate. Am determinat astfel spectrele de absorbție și spectrele diferențiale de absorbție în u.v. ale RN-azei și DN-azei în soluție, în prezența solvenților neapoși și macroanionilor. În legătură cu aceste rezultate, este necesar să specificăm că relațiile dintre modificările spectrului de absorbție în u.v. și cele ale activității enzimatice în interiorul particulei lizozomale reprezintă doar un aspect simplificat al unui fenomen mult mai complex.

Concluziile desprinse dintr-un astfel de model experimental sînt mai mult ipotetice și pot fi completate cu alte date experimentale privitoare la configurația spațială a moleculei de protein-enzimă în particula subce-

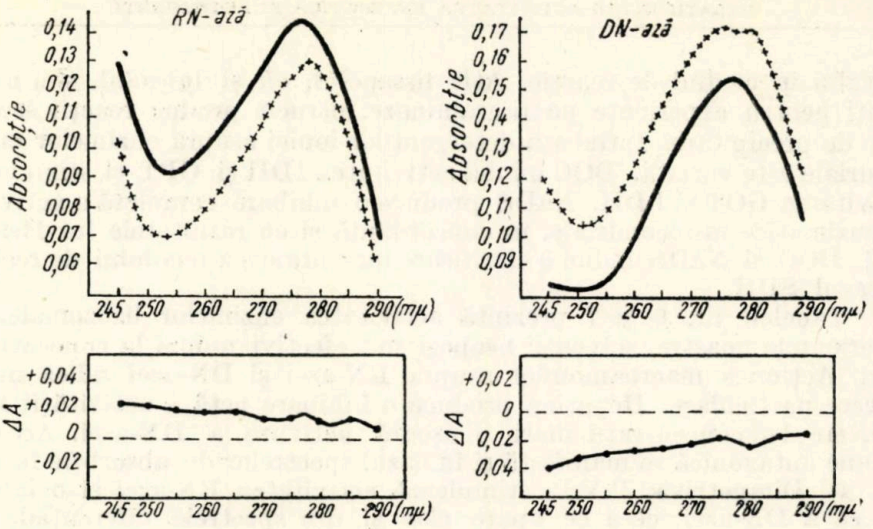


Fig. 4. — Efectul heparinei asupra spectrului de absorbție în ultraviolet al RN-azei și DN-azei.

+ + + enzimă purificată 0,2% în 0,025 M de tampon acetat (pH 5).

——— enzimă purificată în prezența a 20 mg de heparină/mg de proteină-enzimă. Perioada de incubare: 1 oră la 37°C.

●—●—●—● Spectrul de absorbție diferențial al enzimei în prezența heparinei. Perioada de incubare: 1 oră la 37°C. Soluție de referire: 0,2% enzimă purificată în 0,025 M de tampon acetat (pH 5).

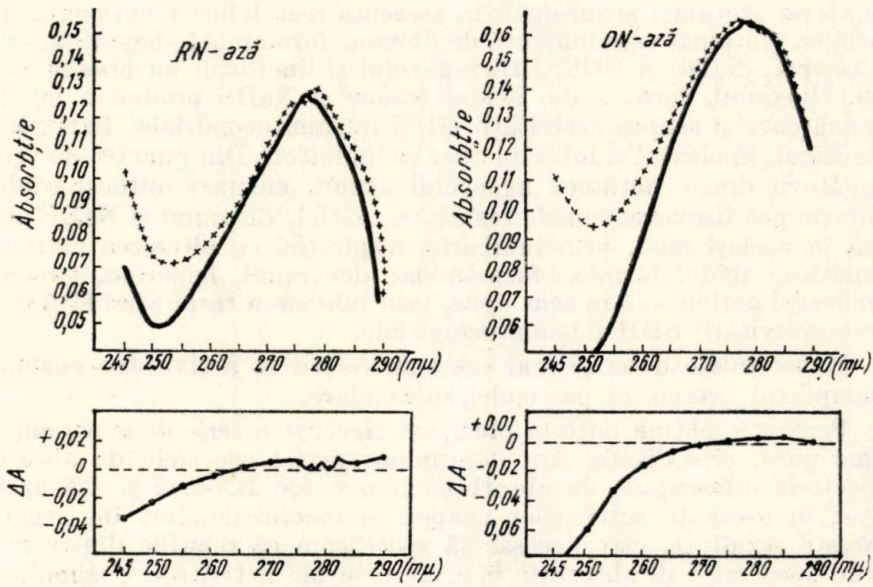


Fig. 5. — Efectul PVP asupra spectrului de absorbție în ultraviolet al RN-azei și DN-azei.

+ + + enzimă purificată 0,2% în 0,025 M de tampon acetat (pH 5).

——— enzimă purificată în prezența a 20 mg de P.V.P./mg de proteină-enzimă. Perioada de incubare: 1 oră la 37°C.

●—●—●—● Spectrul de absorbție diferențial al enzimei în prezența PVP. Perioada de incubare: 1 oră la 37°C. Soluție de referire: enzimă purificată 0,2% în 0,025 M de tampon acetat (pH 5).

Tabelul nr. 8

Efectul solvenților neapoși asupra consumului de oxigen al mitocondriilor de ficat de șobolan

Mediul de reacție (în fiecare vas Warburg): 4 μmoli de tampon Tris (pH 7,4); 40 μmoli de tampon fosfat (pH 7,4); 10 μmoli $MgCl_2$; 4 μmoli ATP; 40 μmoli de substrat; 45 μmoli KCl; 1,0 ml de suspensie standardizată de mitocondrii. Vasul central conține 0,2 ml KOH 20%. Se incubează 60 min la 30°C sub agitare. Activitatea este exprimată în μatomi de oxigen consumat /mg de proteină/oră

Substanța	Martor	Solvenți neapoși								
		Dioxan	Etilen-glicol		Formamidă		Acid formic		Piridină	
Glutamat	0,50	0	0,48	—	0,06	0,14	0,10—0,07	0	0	—
Succinat	0,56	0	—	0,48	0,14	0,10	—	0	—	—
Solvent/mg de proteină în mediul de reacție *		0,006	0,006	0,012	—	0,003	0,006—0,012	0,018—0,012	0,012	—

* ml de solvent neapoș/mg de proteină mitocondrială.

Tabelul nr. 9

Efectul macroanionilor asupra consumului de oxigen al mitocondriilor de ficat de şobolan

(Condiţiile experimentale au fost descrise în tabelul nr. 8).

Substanţa	Martor	Macroanioni											
		Heparină				PVP			Dextrină				
Glutamat	0,50	0	0,36	0,41	0,25	0,34	0,40	0,25	0,31	0,6	0,09	—	—
Succinat	0,56	0,40	0,36	0,24	0,31	—	0,04	—	—	0,05	—	0,06	0,07
Macroanion/mg de proteină în mediul de reacţie *		0,33	0,66	1,32	1,98	0,66	1,32	1,98	0,66	0,99	1,32	1,98	2,54

* mg de macroanion/mg de proteină mitocondrială.

Tabelul nr. 10

Efectul detergenţilor asupra consumului de oxigen al mitocondriilor de ficat de şobolan

(Condiţiile experimentale au fost descrise în tabelul nr. 8).

Substanţa	Detergenţi												
	Neionici								Ionici				
	Martor	Tween					Lubrol		Lis-sapol	Linoleat		DOC	NaDS
Glutamat	0,50	0,02	0,05	—	0,09	0,09	0,32	0,48	0	0,49	0,53	0	0
Succinat	0,56	—	0,29	0,40	—	0	0,14	0,18	0	0,18	0,13	0	0
Detergent/mg de proteină în mediul de reacţie *		0,05	0,13	0,2	0,4	0,8	0,1	0,8	0,2	0,2	0,8	0,4	0,1

* mg de detergent/mg de proteină mitocondrială.

ulară. Efectul dioxanului asupra spectrului de absorbție în u.v. al RN-azei și DN-azei este reprezentat în figura 1. Acest solvent modifică spectrul de absorbție în u.v. al ambelor enzime în același sens, mărind coeficientul de extincție în tot domeniul spectral investigat și în special în regiunile de maxim și minim.

Acțiunea formamidei este reprezentată în figura 2. Spectrul de absorbție al RN-azei în u.v. indică valori mult scăzute ale $\varepsilon_\lambda = 245-255$ mμ

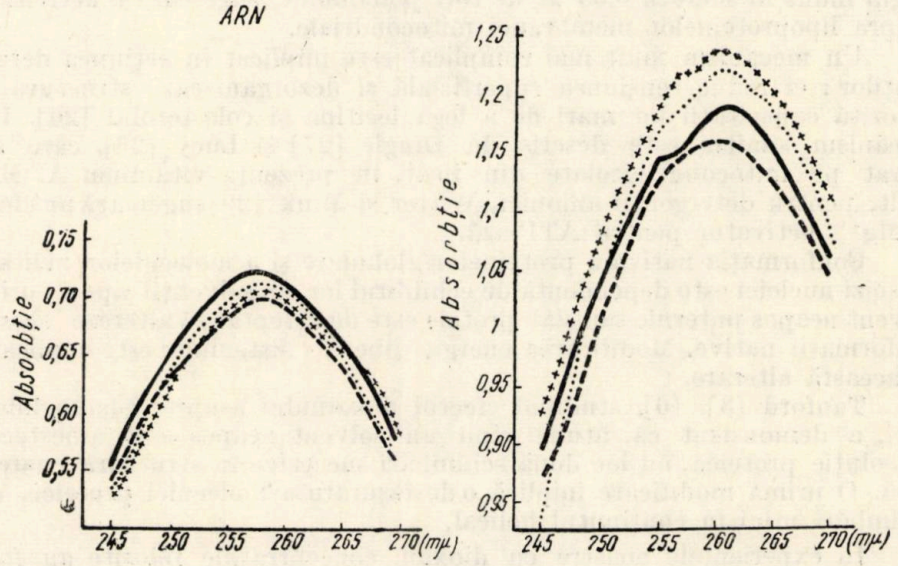


Fig. 6. — Efectul solvenților neapoși asupra spectrului de absorbție în ultraviolet al RNA-ului și DNA-ului.

— — — Soluția de acid nucleic 0,03% în tampon acetat 0,025 M.
+ + + RNA (respectiv DNA) în prezența a 0,5 ml de dioxan/mg de acid nucleic.
· · · RNA (respectiv DNA) în prezența a 0,5 ml de formamidă/mg de acid nucleic.
——— RNA (respectiv DNA) în prezența a 0,5 ml de etilen-glicol/mg de acid nucleic. Perioada de incubare, în toate aceste experiențe, a fost de 1 oră la 37°C.

cu valori negative pe spectrul diferențial. Spectrul DN-azei arată un efect similar, dar mai puțin intens.

Acțiunea etilen-glicolului nu este semnificativă nici asupra spectrelor de absorbție în u.v. (fig. 3) nici asupra activității enzimatice.

Rezultate interesante s-au obținut în cazul heparinei. Acest macroanion important exercită o acțiune opusă asupra DN-azei și RN-azei: spectrul diferențial al RN-azei în u.v. este situat în zona valorilor pozitive, pe cînd cel al DN-azei în zona valorilor negative (fig. 4).

Acțiunea P.V.P. este reprezentată printr-o descreștere a $\varepsilon_\lambda = 245-255$ mμ, mai intensă în cazul DN-azei (fig. 5). Întrucît în literatură există date cu privire la proprietățile acizilor nucleici în solvenți neapoși [21], [24], am extins investigarea noastră asupra spectrelor de absorbție în u.v. ale RNA și DNA. Acțiunea dioxanului, formamidei și etilen-glicolului asupra acizilor nucleici este reprezentată în figura 6.

DISCUȚII

Determinarea swellingului mitocondrial în prezența solvenților neapoși este complicată de efectul lor de clarifiere asupra lipoproteinelor din suspensia mitocondrială. Descreșterea aparentă a swellingului mitocondrial în prezența heparinei poate fi explicată prin activarea lipoproteinlipazei [25]. Efectul dextrinei asupra swellingului cisteinic, ca și swellingul indus în sucroză 0,33 M de toți polianionii, sugerează o activitate asupra lipoproteinelor membranei mitocondriale.

Un mecanism mult mai complicat este implicat în acțiunea detergenților : ei reduc tensiunea superficială și dezorganizează structura ei datorită capacității lor mari de a lega lecitina și colesterolul [26]. Un mecanism similar este descris de Dingle [27] și Lucy [28], care au lucrat pe mitocondrii izolate din ficat, în prezența vitaminei A. Mai mult, pentru detergenții anionici, Witter și Mink [29] sugerează un efect al Mg^{++} activator pentru ATP-ază.

Conformația nativă a proteinelor globulare și a moleculelor helicale de acizi nucleici este dependentă de echilibrul lor cu solvenții apoși : orice solvent neapos puternic sau slab proteic este de așteptat să altereze aceste conformații native. Modificarea energiei libere a sistemului este implicată în această alterare.

Tanford [3], [6], studiind efectul dioxanului asupra β-lactoglobulinei, a demonstrat că, atunci cînd un solvent neapos este amestecat cu soluție proteică, au loc două schimbări succesive în structura cuaternară. O primă modificare implică o desfășurare a moleculei proteice, cu schimbări mici în conținutul helical.

În experiențele noastre cu dioxan, concentrațiile folosite au fost selectate din literatură [2] în așa fel, încît, deși are loc o desfășurare a moleculei proteice, alterarea în conținutul helical este nesemnificativă.

Inhibarea unor enzime lizozomale în astfel de condiții sugerează că centrii lor activi sînt situați în afara regiunilor helicale ale moleculei native de protein-enzimă. Tranziția spre o formă desfășurată, fără alterarea conținutului helical, poate afecta acești centri activi, putînd să explice astfel inhibiția activității enzimatice. Această ipoteză este susținută de spectrul de absorbție în u.v. al RN-azei și DN-azei în prezența dioxanului (fig. 1—2). S-au găsit valori crescute ale coeficientului de extincție în zona maximului de absorbție.

Rezultate similare au fost raportate de Rosenheck și Doty [31] asupra polipeptidelor sintetice. Ele au fost interpretate ca o tranziție spre o formă desfășurată a moleculei. Weber și Tanford [32] raportează pentru RN-ază în etilen-glicol o constantă b_o egală cu 92°C, foarte apropiată de valoarea soluției apoase (105°C). Ei sugerează că nu este modificat semnificativ în etilen-glicol conținutul helicoidal al moleculei. Aceasta este în concordanță cu spectrele de absorbție în u.v. al RN-azei și DN-azei obținute de noi, care nu sînt modificate în etilen-glicol. Pentru RN-ază se observă o schimbare a max. de la 277 mμ în soluție apoasă la 279 mμ în etilen-glicol. Un rezultat similar a fost raportat de Sage

și Singer [33]. Această comportare ar putea fi interpretată prin pierderea hipercromicității, care este caracteristică pentru cele trei reziduuri tirozinice anormale din soluția apoasă a RN-azei [3]. Aceste reziduuri tirozinice în etilen-glicol devin accesibile acțiunii solventului neapos.

Mai dificil de interpretat este efectul etilen-glicolului în particulele subcelulare. Lucrînd pe β-lactoglobulină, Tanford [34] a arătat că doar concentrații mari de etilen-glicol induc schimbări conformaționale în molecula proteică. În experiențele noastre, acest solvent acționează doar pe enzimele mitocondriale, mărind ușor activitatea lor. Este verosimil că în astfel de condiții, pe lîngă grupările cromofore ale moleculei de protein-enzimă să fie de asemenea parțial expuși și cîțiva centri activi. Interreacțiile solvenților neapoși cu moleculele protein-enzimelor în soluții apoase sînt mult mai complicate. Pe lîngă acțiunea hidrofobă și miscibilitatea cu lanțurile hidrocarbonate din molecula proteică, trebuie luate în considerare și alte cîteva elemente. Este posibil ca nivelul ridicat al componentelor lipidice în particulele subcelulare și în membranele lor să determine o asociere funcțională intimă cu solvenții. Nu trebuie să se piardă din vedere faptul că efectul solvenților neapoși asupra diferitelor soluții proteice nu este totdeauna similar. Într-o lucrare recentă, Fasman [35] a raportat studii conformaționale pe poliaminoacizi sintetici în care 2-cloroetanolul, dioxanul și etilen-glicolul cauzează creșterea valorilor b_0 ale copoli-L-glu-L-leu, 77 : 23, de la 555 la 890 și a valorilor b_0 ale poli-L-glutamic acid de la 460 la 700.

Deci modul în care modelele proteice răspund variației solventului reprezintă un caz foarte special. Forțele principale operative sînt, probabil, legăturile de hidrogen ale scheletului helical peptidic (elicoidal peptide backbone), interreacțiile hidrofobe și interreacția carboxil-carboxil.

Dacă conformația proteinelor în soluție apoasă este stabilizată prin interreacții liofobice, este de așteptat ca în prezența solvenților neapoși să apară alterări substanțiale. Teoretic, instabilitatea ar trebui să fie mai mică în solvenți neapoși nemiscibili cu lanțurile hidrocarbonate, de exemplu etilen-glicolul, și mai mare cînd este posibil amestecul. Experiențele noastre concordă cu acest punct de vedere.

Acidul formic și piridina inhibă activitatea enzimatică datorită alterării moleculei proteice, care devine protonată în solvenți puternic acizi și deprotonată în baze puternice. Din acest punct de vedere, o mențione specială o merită SDH. Această enzimă transferă electronii pe lanțul respirator, eliberînd protonii corespunzători în mediu. Astfel, molecula proteică a SDH pare să fie surprinzător de rezistentă la acțiunea de protonare a solvenților puternic acizi, în timp ce activitatea tuturor celorlalte dehidraze mitocondriale este complet abolită.

Aceste ipoteze concordă cu rezultatele noastre asupra consumului de oxigen de către mitocondrii. În interpretarea acestui mecanism mult mai complicat trebuie să se țină seama atît de toate componentele lanțului transportor de electroni (ETC), care desăvîrșesc în final consumul de oxigen, cît și de proprietățile fizico-chimice ale mediului celular cerute de transportul de electroni. Se poate astfel explica inhibiția respirației

cu succinat în prezența acidului formic prin alterarea unei proteine de pe lanțul transportor de electroni, deși SDH intramitocondrial nu este afectat. În același fel, formamida este un inhibitor puternic al consumului de oxigen, fără efect asupra activității enzimatice a SDH intramitocondrial. Constanta sa dielectrică neobișnuit de mare poate determina condiții nefavorabile pentru transportul de electroni, și deci să limiteze respirația cu succinat. Formamida modifică spectrul de absorbție în u.v. al RN-azei și DA-azei, micșorînd coeficientul de extincție în zona spectrală $\lambda = 245-250$ mμ. Acest efect, mult mai evident pentru RN-ază, poate fi corelat cu inhibiția activității enzimatice a RN-azei lizozomale în prezența formamidei. O mențiune specială pentru molecula LDH în interiorul mitocondriei : rezultatele noastre arată că această enzimă este activată de majoritatea agenților utilizați. Această particularitate trebuie să corespundă unor caracteristici de structură și conformație spațială, diferite de alte dehidraze mitocondriale. În legătură cu aceasta, este interesant de menționat rolul metabolic special jucat de această enzimă la intersecția celor două căi glucidice principale : Embden-Meyerhof și ciclul Krebs. Întrucît în literatură există lucrări care arată acțiunea solvenților neapoși asupra acizilor nucleici [22], noi am extins de asemenea studiul spectrului de absorbție în u.v. și la RNA și DNA. În felul acesta am încercat să coroborăm efectul solvenților neapoși pe enzimele lizozomale cu efectul lor respectiv asupra substratului corespunzător.

Ca și pentru proteine, forțele hidrofobe sînt importante în stabilizarea structurii DNA-ului nativ. Teoretic, solvenții neapoși vor modifica această conformație nativă prin descreșterea interacțiunilor liofobe. Rezultatele noastre, în concordanță cu datele lui Helmkamp [36], confirmă ipoteza de mai sus. Spectrele de absorbție în u.v. ale DNA (fig. 6) arată o creștere a coeficientului de extincție în zona spectrală λ max., demonstrînd o prăbușire a conformației elicoidale și o tranziție helix → formă desfășurată. În experiențele noastre, eficiența solvenților găsită pe spectrele de absorbție în u.v. este în concordanță cu seria de eficiență găsită pentru acești solvenți neapoși de Herskovitz [22—24].

În legătură cu mecanismul activității macroanionilor, cîteva fapte trebuie evidențiate : inhibiția activității RN-azei de către heparină trebuie să fie corelată cu creșterea coeficientului de extincție în zona maximului de absorbție, conducînd spre un spectru diferențiat, cu valori pozitive distincte. În opoziție, spectrul de absorbție în u.v. diferențial al DN-azei plus heparină prezintă valori negative. La nivel lizozomal, activitatea enzimatică nu este semnificativ afectată. În contrast cu heparina, P.V.P.-ul inhibă activitatea DN-azei în lizozomi. Pe spectrul de absorbție în u.v. al enzimei cristaline se observă o descreștere a $\varepsilon_\lambda = 245-250$ mμ.

Este posibil ca acest efect să atingă un grad special, pentru a fi corelat cu activitatea fiziologică a enzimei. Astfel, formamida care modifică spectrul în ultraviolet în același fel, dar într-un grad mai scăzut, nu este eficientă asupra particulei lizozomale.

Influența macroanionilor investigați de noi asupra enzimelor lizozomale este de un interes special, datorită folosirii lor largi în practica

medicală. Deoarece enzimele lizozomale sînt neobișnuit de „agresive", acest efect trebuie luat în considerare pe lîngă interacțiunile clasice cu factorii sanguini de coagulare. Macroanionii inhibă consumul de oxigen fără modificarea activității dehidrazelor. Deaorece ei au o influență clară asupra lipoproteinelor din membranele mitocondriale, descreșterea consumului de oxigen devine ușor explicabilă. Mai mult, a fost raportat efectul atît al macroanionilor, cît și al macrocationilor asupra unor componente ale lanțului transportor de electroni [37—39].

În ceea ce privește activitatea detergenților, majoritatea efectelor asupra dehidrazelor se datoresc interacțiunii cu membranele lipoproteice ale mitocondriilor. NaDS alterează puternic structurile proteice, așa cum raportează anterior Hersch [20]. În experiențele noastre se observă o abolire intensă a activității enzimatice mitocondriale, ceea ce sugerează o acțiune directă asupra conformației moleculei de proteină. Privind mecanismul de activitate al NaDS, se poate presupune că centrii activi ai enzimelor investigate sînt situați într-o regiune a moleculei proteice bogată în legături intrapeptidice de tip necovalent. DOC este cunoscut în literatură ca un agent eficient pentru solubilizarea și extragerea dehidrazelor mitocondriale [40]. În condițiile noastre experimentale DOC a fost eficient doar în cazul GOT și IDH a căror activitate enzimatică crește. Cîțiva detergenți au un efect opus asupra enzimelor mitocondriale, de exemplu DOC mărește activitatea GOT și inhibă GPT. Acest fenomen se datorește compartimentării diferite a protein-enzimei în interiorul mitocondriei. În acest fel, anumite grupări chimice ale moleculelor enzim-proteice sînt mai mult sau mai puțin accesibile acțiunii detergentului.

Laboratorul de biochimie al Spitalului clinic
„Fundeni", București

Prezentată la redacție la 8 iulie 1965

BIBLIOGRAFIE

1. J. D. Bernal, Discussion Faraday Soc., **25**, 7 (1958).
2. S. I. Singer, Adv. Protein Chem., **17**, 1 (1962).
3. C. Tanford, J. D. Hauenstein and D. G. Rands, J. Amer. Chem. Soc., **77**, 6409 (1960).
4. P. Jurtschuk, I. Seguku and D. E. Green, Biochem. Biophys. Res. Commun., **6**, 76 (1961).
5. C. Tanford, P. K. De and Y. G. Taggart, J. Amer. Chem. Soc., **82**, 6028 (1960).
6. C. Tanford and P. K. De, J. biol. Chem., **236**, 1711 (1961).
7. R. Wattiaux and C. de Duve, Biochem. J., **4**, 606 (1956).
8. H. Beaufay, O. S. Bendall and C. de Duve, Biochem. J., **73**, 623 (1959).
9. S. Comoroșan, S. Solomon and M. Stănescu, 6th Intern. Congr. Biochem., New York, vol. IV, 1964, p. 26.
10. W. C. Schneider and G. H. Hogeboom, J. biol. Chem., **183**, 123 (1950).
11. E. C. Slater and W. D. Bonner, Biochem. J., **52**, 185 (1952).
12. C. H. Gallager, Biochem. J., **74**, 38 (1960).
13. J. F. Scarfe and P. Alexander, Rad. Res., **15**, 658 (1961).
14. S. K. Wolfson and H. G. Williams-Ashman, Proc. Soc. exptl. Biol. Med., **96**, 231 (1957).

15. P. BRUYET, C. M. GAUTHIER and P. DELAUNAY, Presse méd., **92**, 2113 (1958).
16. C. de DUVE, B. C. PRESSMAN, R. GIANETTO, R. WATTIAUX and F. APPELMANN, Biochem. J., **60**, 604 (1955).
17. D. NEUBERT and A. LEHNINGER, J. biol. Chem., **237**, 952 (1962).
18. R. ROWAND and J. C. CHAFFER, Amer. J. Physiol., **201**, 29 (1961).
19. O. H. LOWRY, N. J. ROSENBROUGH, L. FARR and R. J. RANDALL, J. biol. Chem., **193**, 265 (1951).
20. R. T. HERSCH, Biochem. biophys. acta., **58**, 353 (1962).
21. E. P. GEIDUSCHEK and I. GRAY, J. Amer. Chem. Soc., **78**, 879 (1956).
22. T. T. HERSKOVITZ, S. I. SINGER and E. P. GEIDUSCHEK, Arch. Biochem. Biophys., **94**, 99 (1961).
23. E. P. GEIDUSCHEK and T. T. HERSKOVITZ, Arch. Biochem. Biophys., **95**, 114 (1961).
24. T. T. HERSKOVITZ, Arch. Biochem. Biophys., **97**, 474 (1962).
25. E. D. KORN, J. biol. Chem., **215**, 1 (1955).
26. B. S. ROOF and I. C. AUB, Cancer Res., **20**, 1436 (1960).
27. I. DINGLE, Biochem. J., **84**, 76 (1962).
28. I. A. LUCY, Biochem. J., **88**, 31 (1962).
29. R. F. WITTER and W. MINK, J. Biophys. Biochem. Cytol., **4**, 73 (1958).
30. W. MOFFIT and I. T. YANG, Proc. natl. Acad. Sci. U. S., **42**, 596 (1956).
31. K. ROSENHECK and P. DOTY, Proc. natl. Acad. Sci. U. S., **47**, 1775 (1961).
32. R. E. WEBER and C. TANFORD, J. Amer. Chem. Soc., **81**, 3255 (1959).
33. H. I. SAGE and S. I. SINGER, Biochemistry, **1**, 305 (1962).
34. C. TANFORD, C. E. BUCKLEY, P. K. and E. P. LIVELY, J. biol. Chem., **237**, 1168 (1962).
35. G. D. FASMAN, C. LINDLOW, E. BODENHEIMER. Biochemistry, **3**, 155 (1964).
36. G. K. HELMKAMP and P. O. P. TS'O, J. Amer. Chem. Soc., **83**, 138 (1961).
37. P. PERSON and A. S. FINE, Science, **132**, 43 (1960).
38. P. PERSON and A. S. FINE, Arch. Biochem. Biophys., **94**, 392 (1961).
39. P. PERSON, P. T. MORA and A. S. FINE, J. biol. Chem., **238**, 4103 (1963).
40. L. T. KREMZNER and W. W. WAINIO, Biochem. Biophys. Acta, **52**, 208 (1961).

ST. CERC. BIOCHIM., 9, 2, 167–179 (1966)

INTRODUCEREA ŞI TRANSLOCAREA ACIDULUI RIBONUCLEIC DIN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* ŞI A ACIDULUI DEZOXIRIBONUCLEIC DIN SEMINŢE DE TUTUN BEL 61—10, ÎN PLANTE DE TOMATE *

VIORICA FRUNZETI

612.398.145.1

Rezumat. — Cercetările efectuate cu ARN din drojdie de bere, precum şi cu ADN din seminţe încolţite de tutun Bel 61—10, introduşi prin metoda capilară în partea inferioară a tulpinilor de tomate, au arătat că aceşti compuşi pătrund şi se translocă, putînd fi regăsiţi după un interval de timp atît în părţile superioare ale tulpinii, cît şi în frunze. S-a cercetat, de asemenea, migrarea pe hîrtie cromatografică a acizilor nucleici menţionaţi şi se discută eventuala analogie a migrării acestor compuşi pe hîrtie cromatografică cu translocarea lor în plante.

S-a pus la punct şi un procedeu de izolare a ADN din seminţele încolţite de tutun Bel 61—10.

Migrarea AN în ţesuturile plantelor şi translocarea lor prin fasciculele conducătoare ale acestora prezintă interes pentru cercetarea acţiunii acestor compuşi asupra plantelor, dat fiind rolul lor în biosinteza proteinelor şi enzimelor, în metabolism în general, în transmiterea caracterelor ereditare etc. Numărul lucrărilor publicate pînă acum în acest domeniu este restrîns şi ele se referă mai ales la unele aspecte ale migrării AN în seminţe în cursul încolţirii, problemei translocării acestor acizi prin vasele conducătoare ale plantelor fiindu-i acordată mai puţină atenţie.

Astfel, Oota şi Osawa [1] au arătat că ARN din cotiledoanele seminţelor încolţite de fasole scade rapid în cursul germinării, migrînd în ţesuturile embrionului, şi Oota a emis o ipoteză cu privire la mecanismul acestei migrări [2], [3]. Sormova [4], urmărind variaţiile ARN şi ADN la seminţele de mazăre în cursul încolţirii, a constatat de asemenea migrarea acestor acizi precum şi a componentelor lor, din organele de rezervă către părţile plantei în dezvoltare, în special către

* Lucrare publicată în Rev. roum. Biochim., 3, 2 (1966), în limba franceză.

părţile ei axiale. Mai menţionăm aici şi lucrările efectuate de Ledoux şi Huart [5], după care AN din drojdia de bere, marcaţi cu C^{14} şi H^3, pot pătrunde din soluţii în seminţele de orz în încolţire şi pot migra prin ţesuturile acestor seminţe, fiind regăsiţi în coleoptil şi în rădăcini. Aceiaşi autori au arătat că în aceste condiţii migrează nu numai ARN, ci şi ADN [6].

În ceea ce priveşte translocarea AN prin vasele conducătoare ale plantelor superioare, nu s-au publicat decît puţine lucrări, iar acestea cuprind numai indicaţii cu privire la eventuala posibilitate de translocare a AN, lăsînd în fond problema încă deschisă. Astfel, Martos [7], stabilind că inhibiţia cu tripaflavină a AN din rădăcinile de plăntuţe de grîu duce la scăderea metabolismului proteic din părţile aeriene ale plantelor, a ajuns la concluzia că „una dintre cele mai importante funcţii ale sistemului radicular constă în aprovizionarea părţilor aeriene ale plantelor cu acizi nucleici sau cu componentele lor prezente în rădăcini", fără însă a preciza modul în care se face această aprovizionare şi fără a se referi la eventuala translocare a acestor compuşi. Tarasenko şi Kovalenko [8] au identificat „compuşi de tipul acizilor nucleici" în seva fasciculelor conducătoare ale plantelor de tomate crescute pe soluţie nutritivă ce conţine P^{32} şi au ajuns la concluzia că „aceşti compuşi *se pot* transloca prin vasele conducătoare ale plantelor, ajungînd acolo, se pare, prin membranele celulare", menţionînd că ei n-au stabilit dacă compuşii semnalaţi sînt într-adevăr acizi nucleici cu greutate moleculară mare. De asemenea, Ziegler şi Kluge [9] au constatat prezenţa atît a ADN-ului , cît şi a ARN-ului în seva vaselor ciuruite de *Robinia pseudoacacia* şi consideră că „este *foarte probabil* că ambii acizi nucleici sînt translocaţi prin vasele ciuruite". Din citatele de mai sus rezultă că, deşi în lucrările menţionate se exprimă păreri cu privire la posibilitatea translocării AN în plante, totuşi dovezi directe în acest sens nu au fost aduse.

Una dintre posibilităţile de demonstrare directă a translocării acizilor nucleici prin vasele conducătoare ale plantelor ar putea fi introducerea soluţiei acestor acizi într-o parte a plantei, de exemplu în partea inferioară a tulpinii, şi urmărirea creşterii conţinutului în AN în părţile superioare ale tulpinii aceleiaşi plante, precum şi în frunze.

Pentru introducerea substanţelor în plante se cunosc diferite metode, ca : aplicarea soluţiilor pe frunze, fie sub formă de picături, fie înglobate în agar-agar, lanolină etc. [10]; stropirea cu soluţii a diferitelor părţi ale plantei [11] [12]; injectarea soluţiilor în tulpină [13]; introducerea rădăcinilor în soluţii [14]; fixarea în tulpină sau în frunze a unui fitil prin care soluţiile pot ajunge în plante [15], [16] şi altele*. Nici una dintre aceste metode nu permite însă măsurarea vitezei de

* Printr-o scrisoare (ian. 1965), dr. G. Schuman (Dornburg) ne-a adus la cunoştinţă că a reuşit să realizeze introducerea mai rapidă a soluţiilor în plante, procedînd după cum urmează : „der untere Teil des angeschnittenen Stengels wird in das Gläschen getaucht in dem sich das Substrat befindet".

pătrundere a soluțiilor în plante și nici stabilirea cantității de substanță pătrunse. De aceea am preferat să recurgem la metoda capilară [17], care permite introducerea continuă și îndelungată a soluțiilor diferitelor substanțe în corpul plantelor întregi menținute în timpul tratamentului în condiții normale de existență. Această metodă se bazează pe fixarea fie în tulpină, fie în altă parte a plantei a unui fitil de bumbac al cărui capăt liber se introduce în soluția respectivă; soluțiile pătrund prin capilaritate în sistemul vaselor conducătoare și se răspîndesc în plante, unde își pot exercita acțiunea lor asupra biochimismului acestora. Prin acest procedeu au fost introduse în diferite plante : azotatul de amoniu [18], hormoni vegetali [19] și animali [20], prolină [21], sulfat de cupru, soluții de alți electroliți, glucide, unele substanțe narcotice și curarizante, soluțiile-tampon de diferite pH-uri [22], cloramină, saponină, albastru de metilen [23], coloranți ca pironina și albastrul de metilen [24], colchicina [25] etc., și s-a cercetat acțiunea substanțelor introduse atît asupra plantelor, cît și asupra unor aspecte ale biochimismului acestora. Ar fi deci de așteptat ca și soluții de AN să poată fi introduse în același mod.

În cadrul cercetărilor cu AN ar trebui ținut seama și de faptul că aceștia, datorită naturii lor chimice și tendinței puternice de adsorbție se deosebesc de toți compușii menționați introduși pînă acum în plante prin metoda capilară. Cercetările noastre anterioare au arătat că viteza de pătrundere în plante a soluțiilor introduse în condițiile metodei capilare depinde de diferiți factori, printre care și de natura substanței introduse [23]. Astfel, soluțiile de cloramină T 0,1% , albastru de metilen 0,1% și vitamină C 2% pătrund în plante de *Solanum lycopersicum* și de *Anthirrhinum majus* cu o viteză mai mare decît a apei, spre deosebire de soluțiile de saponină 0,1%, care în toate cazurile experimentate pătrund cu o viteză mai mică sau egală cu cea a apei. De asemenea, s-a constatat că viteza de translocare a unor coloranți prin vasele conducătoare ale plantelor depinde de fenomenele de adsorbție care se produc la nivelul acestor vase [24]. S-a constatat, de exemplu, că translocarea pironinei în soluție de 0,5‰, respectiv a albastrului de metilen 0,5‰ în tulpinile de tomate și balsamine are loc în mod diferit : pironina se translocă mai repede decît albastrul de metilen, fie că soluțiile se introduc separat, fie în amestec. Înseamnă că însăși posibilitatea de introducere a unor cantități mai însemnate de AN în plante ar depinde de viteza cu care soluțiile lor pot pătrunde în organismul vegetal; că trecerea soluțiilor AN prin fitil ar putea fi însoțită de modificări de concentrații în urma adsorbției acestor acizi pe fitil; și că translocarea AN introduși în plante ar depinde de intensitatea cu care ei se adsorb la nivelul vaselor conducătoare. De altfel, tot din lucrările noastre anterioare a reieșit, cel puțin în cazul coloranților (pironina și albastrul de metilen), un paralelism între modul de translocare în plante [24] și modul de migrare pe hîrtia cromatografică. Așa fiind, cercetarea migrării AN pe hîrtie ar putea da, eventual, unele indicații indirecte cu privire la posibilitatea translocării lor în plante.

Ținînd seama de considerațiile de mai sus, am socotit necesar să cercetăm :

1. Modul de trecere a soluţiei AN printr-un fitil de bumbac, pentru a stabili dacă în decursul acestei treceri se ajunge la o eventuală scădere a concentraţiei acestor acizi în soluţie datorită adsorbţiei lor pe fibrele fitilului.

2. Modul de migrare pe hîrtie cromatografică a acelor AN care ne vor servi la cercetarea translocării în plante, pentru obţinerea unor indicaţii indirecte asupra posibilităţii translocării.

3. Dacă concentraţia AN în părţile superioare ale tulpinii şi în frunzele unei plante creşte sau nu în urma introducerii soluţiilor de acizi nucleici în partea inferioară a tulpinii prin metoda capilară, pentru a stabili în acest fel dacă are loc sau nu translocarea acestor acizi în plantă.

Pentru această cercetare am folosit :

a) ARN izolat din drojdia comercială (*Saccharomyces cerevisiae*) după procedeul indicat de Belozerski [26];

b) ARN comercial firma Loba (Viena);

c) ARN comercial firma Chinoin (Budapesta);

d) ADN izolat de noi din seminţe de tutun Bel 61—10 după 7 zile de la încolţire (prelucrate împreună cu plantele respective).

Modul de obţinere a acidului dezoxiribonucleic. 200 g de seminţe de tutun Bel 61—10 după 8 zile de germinare se omogenizau în vederea delipidării în Turmix cu 200 ml de acetonă (4—6°C) timp de 5 min. După îndepărtarea părţii lichide prin filtrare la trompă, materialul se lasă pînă a doua zi la temperatura camerei; în stare uscată, acest material poate fi păstrat timp mai îndelungat şi prelucrat după nevoie. 30 g din materialul menţionat s-a mojarat manual suficient de energic pentru asigurarea sfărîmării ţesuturilor, adăugîndu-se treptat 120 ml de soluţie-tampon 0,1 M NaCl, 0,025 M Tris-HCl (pH 7,5*), 0,01 M EDTA (NaCl-Tris-EDTA). Se centrifughează la 4 000 rot/min, timp de 30 min, la +2°C. Supernatantul se îndepărtează, iar sedimentul se suspendă în 80 ml din tamponul menţionat. Se repetă centrifugarea. Menţionăm că tamponul este cel folosit de Lyttleton [27]; în această etapă, prezenţa în mediu a EDTA provoacă inhibarea nucleazelor, iar soluţia 0,1 M NaCl provoacă solubilizarea acidului ribonucleic. Sedimentul care include dezoxiribonucleoproteide este supus apoi operaţiilor de deproteinizare, după Marmur [28]. Pentru aceasta, se suspendă în 180 ml NaCl 1 M, la care s-a adăugat în prealabil 1% dodecil-sulfat de sodiu şi se agită o oră la temperatura camerei. Se centrifughează la 4 000 rot/min, timp de 30 min, la +4°C. Prin această operaţie, soluţia 1 M de NaCl solubilizează dezoxiribonucleoproteinele, iar dodecil-sulfatul de sodiu (detergent anionic) denaturează proteinele şi produce totodată inhibarea enzimelor. Supernatantul (125 ml), care conţine produsul ce ne interesează, se toarnă în vină subţire peste 1,5 volume de alcool etilic 96% (+4°C), se formează filamente mucilaginoase şi apare o slabă opalescenţă (suspensie fină). Pînă a doua zi la frigider (4°C) se adună la suprafaţă un strat de filamente, iar la fund se sedimentează un precipitat nefilamentos. Se amestecă totul, deoarece şi precipitatul nefilamentos conţine o mică cantitate de ADN şi se centrifughează la 2 500 rot/min, timp de 10 min, la +4°C. Sedimentul se supune operaţiilor de deproteinizare, de astă dată cu cloroform-alcool izoamilic, în modul următor: se suspendă în 35 ml NaCl 1 M, se amestecă cu acelaşi volum de cloroform-alcool izoamilic

* Tamponul Tris-HCl se prepară după indicaţiile date de G. Gömöri: *Preparation of Buffers for use in Enzyme Studies*, din *Methods of Enzymology*, sub redacţia S.P. Collowick şi N. O. Kaplan, vol. I, Academic Press, New York, 1955, p. 138.

(24 : 1) şi se agită timp de 30 min la temperatura camerei, apoi se centrifughează la 4 000 rot/min, timp de 20 min, la 4°C. Se formează trei straturi : stratul de jos, incolor şi transparent, este alcătuit din cloroform ; stratul din mijloc, de culoare albă şi cu o consistenţă gelatinoasă, conţine proteine, iar stratul superior, slab gălbui şi opalescent, conţine încă nucleoproteine. Stratul lichid superior se supune în continuare operaţiilor de deproteinizare (o agitare de 15 min este suficientă), pînă cînd stratul mijlociu, ce conţine proteine, nu se mai formează ; în cazul nostru au fost necesare 6—7 operaţii de deproteinizare. Supernatantul obţinut la ultima operaţie de deproteinizare se toarnă peste 1,5 volume de alcool etilic 96%, în prealabil răcit (+4°C). Se formează filamente albe, de data aceasta nemucilaginoase, care se înfăşoară pe baghetă, se spală repetat de două-trei ori cu alcool şi acetonă şi se usucă prin apăsare uşoară pe hîrtie de filtru. Se dizolvă prin frecare cu cantităţi mici de apă distilată (50 ml). Deoarece pentru scopul urmărit de noi în lucrare nu era necesar un ADN de o înaltă puritate, ne-am oprit la această fază.

1. *Trecerea soluţiilor de acizi nucleici prin fitil.* Pentru a stabili dacă în decursul acestei treceri se ajunge la o eventuală scădere a concentraţiei acestor acizi în soluţie, s-a procedat în modul următor : soluţia de ARN (*a*), respectiv ADN (*d*), era pusă într-un tub A (fig. 1) utilizat în metoda capilară [17, p. 184] şi lăsată să treacă în vasul B prin fitilul compus din 8 fire de bumbac ; capătul liber al fitilului era lăsat aproximativ cu 3 cm mai jos decît baza tubului, ceea ce permitea sifonarea soluţiei prin fitil. Pentru evitarea evaporării, totul se afla sub un clopot de sticlă. Pe măsură ce soluţia trecea prin fitil în vasul B, se completa nivelul soluţiei în tub. S-a dozat AN atît în soluţia din tubul A, cît şi în cea colectată în vasul B, prin determinări de dezoxiriboză după Dische [29], de riboză după Mejbaum [30], fosfor după Allen [31] prin absorbţie la fotocolorimetrul Pulfrich la 600 mμ, cuva 1 000 şi baze prin absorbţia în UV la 260 mμ (spectrofotometrul VSU 1).

Din valorile obţinute (tabela nr. 1) se constată că, în decursul trecerii prin fitilul de bumbac, soluţia de AN nu-şi modifică concentraţia. Chiar dacă se produce o anumită adsorbţie, ea este neglijabilă în condiţiile metodei capilare.

2. *Migrarea acizilor nucleici pe hîrtie cromatografică.* În această problemă, literatura cuprinde puţine date. Astfel, de exemplu, Bendich şi Rosenkranz [32] au constatat că viteza de migrare pe hîrtie cromatografică a ADN de diferite proteine este „o reflectare a structurii macromoleculare şi creşte cu degradarea moleculei" ; de pe altă parte, în aceleaşi condiţii de lucru ARN nu se deplasează de pe start, datorită — după afirmaţia autorilor — unor procese de salifiere a moleculei cu componenta NaCl din solvent. Ebel şi colab. [33], încercînd separarea pe hîrtie cromatografică a ARN din drojdie de polifosfaţii anorganici, au constatat că ARN rămîne pe start, în timp ce polifosfaţii anorganici migrează o dată cu frontul solventului.

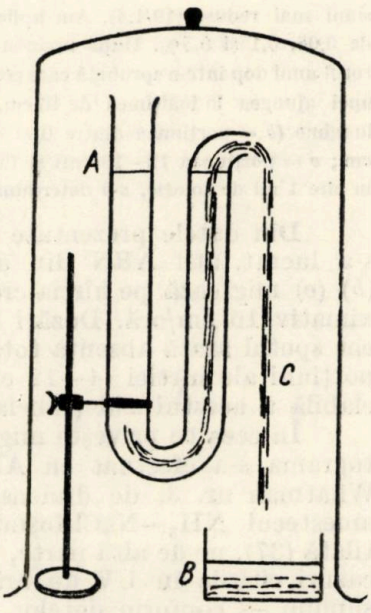


Fig. 1. — *A* — tubul capilar în care se introduce soluţia de acizi nucleici.
B — vasul în care se face irigarea soluţiei de acizi nucleici.
C — fitilul de bumbac format din 8 fire.

Identificarea pe hîrtie cromatografică a acizilor nucleici se efectuează, în general, prin observaţia directă în UV a densităţii optice a spoturilor [34], [35]; ADN mai poate fi identificat şi prin colorarea spoturilor cu verde de metil (Kurnick, 1953, citat de [32]).

Noi am urmărit migrarea ARN (*a*) (*b*) (*c*) pe hîrtie cromatografică prin eluarea diferitelor porţiuni ale hîrtiei şi dozarea acidului în eluant, fie prin determinări de pentoze, fie prin determinări de baze, iar migrarea ADN prin examinarea hîrtiei direct în UV. Am folosit ARN (*a*) (*b*) (*c*). Am recurs la procedeul Mathias [36], folosind însă fîşii de hîrtie de dimen-

Tabela nr. 1

Conţinutul în acizi nucleici al soluţiei apoase înainte şi după trecerea prin fitilul de bumbac, exprimat în densităţi optice; citiri la fotocolorimetrul Pulfrich la 600 mμ, cuva 1000 (pentoze, fosfor); spectrofotometrul VSU 1, la 260 mμ, cuva 1 030 (baze)

AN	Soluţia iniţială (tub A)			Soluţia colectată (vas B)		
	pentoze	baze	fosfor	pentoze	baze	fosfor
ARN (*a*)	0,42	0,95	0,89	0,44	0,90	0,80
ADN (*d*)	0,50	0,21	0,48	0,55	0,24	0,45

siuni mai reduse (19/1,4). Am aplicat spoturi de 0,1 ml de soluţie de AN în concentraţii de 0,05, 0,1 şi 0,5%. După uscarea spotului, fîşia de hîrtie se fixa pentru irigare cu ajutorul unui dop într-o eprubetă care conţinea 2 ml de apă distilată. După 60—80 min, cînd frontul apei ajungea la înălţimea de 16 cm, hîrtia, încă umedă, se tăia în porţiuni de cîte 4 cm, lungime (*b* = porţiunea dintre 0 şi 4 cm; m_1 = porţiunea 4—8 cm; m_2 = porţiunea 8—12 cm; *v* = porţiunea 12—16 cm) şi fiecare porţiune se elua în cîte 2 ml de apă. După o oră, în cîte 1 ml de soluţie, s-a determinat riboza după Mejbaum [30].

Din datele prezentate (tabela nr. 2) reiese că, în condiţiile în care s-a lucrat, atît ARN din drojdie izolat de noi (*a*) cît şi cel comercial (*b*) (*c*) migrează pe hîrtia cromatografică cu viteză destul de mare, aproximativ 16 cm/oră. Dozări efectuate chiar pe porţiunea pe care s-a aplicat spotul arată absenţa totală a acestui acid. De asemenea, pe primele porţiuni ale hîrtiei (4—12 cm) nu s-a putut constata o cantitate apreciabilă a acestui acid (tabela nr. 3).

În ceea ce priveşte migrarea ADN pe hîrtie cromatografică, cromatograma s-a efectuat cu ADN extras din seminţe de tutun, pe hîrtie Whatman nr. 3, de dimensiuni 53/10, spot 0,5 ml, folosind ca irigant amestecul NH_3—NaCl-fosfat disodic [32], pe de o parte, şi apă distilată (37), pe de altă parte, timpul de irigare fiind de 18 ore. În ambele cazuri citirile în UV au arătat că ADN rămîne pe start, ceea ce presupune — conform datelor din literatură [32] — o înaltă polimerizare a moleculei.

Cercetările efectuate arată că, cel puţin în cazul AN cu care am lucrat migrarea pe hîrtie cromatografică este diferită; ARN migrează, pe cînd ADN rămîne pe start. De altfel, din unele date din literatură [32] se constată că migrarea ARN depinde de condiţiile în care se lu-

crează, şi anume acest acid nu migrează de pe start atunci cînd lichidul de irigare conţine 0,2 M NaCl, dar migrează o dată cu frontul solventului cînd soluţia de 0,2 M NaCl este înlocuită.

Prin urmare, dacă ar exista un paralelism între migrarea AN pe hîrtie cromatografică şi eventuala lor translocare de-a lungul fasciculelor

Tabela nr. 2

Conţinut de ARN (*a*, *b*, *c*) eluaţi de pe hîrtia cromatografică (*b* = 0—4 cm; m_1 4—8 cm; m_2=8—12 cm; *V*=12—16 cm), exprimată în densităţi optice. Citiri la fotocolorimetrul Pulfrich, la 600 mμ, cuva 1 000 (pentoze)

AN	*b*	m_1	m_2	*V*
ARN (*a*)				
0,05 %	0,052	0,090	—	0,200
0,50 %	0,060	—	—	0,130
0,50 %	0,011	0,024	0,098	0,242
ARN (*b*)				
0,1 %	0,051	0,090	0,190	0,730
ARN (*c*)				
0,05 %	0,051	0,070	—	0,075
0,50 %	0,055	—	—	0,335
0,50 %	0,008	0,025	0,043	0,550

conducătoare ale plantelor, ar fi de aşteptat ca ARN introdus în plante prin metoda capilară să fie translocat, iar ADN să rămînă adsorbit în regiunea locului de introducere.

Tabela nr. 3

Conţinut de ARN (*a*) eluat de pe hîrtia cromatografică (*b* = 0—4 cm; m_1 = 4—8 cm; m_2 = 8—12 cm; *V* = 12—16 cm), exprimată în densităţi optice. Citiri la spectrofotometrul VSU 1, la 260 mμ, cuva 1 000 (baze)

AN	*b*	m_1	m_2	*V*
ARN (*a*)				
0,5 %	0,028	0,029	0,043	1,100

3. *Cercetarea translocării acizilor nucleici în plante.* Pentru a stabili dacă concentraţia AN în părţile superioare ale tulpinii şi în frunzele unei plante creşte sau nu în urma introducerii soluţiilor de AN, prin metoda capilară, în partea inferioară a tulpinii, am procedat în modul următor: plante de tomate din soiurile Zeelandia şi Pomodoro, crescute în condiţii de seră şi menţinute întregi, despicate [38], [39], precum şi cu rădăcina îndepărtată [40], au fost tratate cu ARN din drojdie (*a*) şi cu ADN din seminţe încolţite de tutun (*d*). Introducerea AN s-a realizat prin metoda capilară în primele două cazuri şi prin cufundarea directă a tulpinii în soluţia respectivă în cel de-al treilea caz. După un anumit interval de timp de la introducerea acizilor nucleici, am procedat la extracţia lor atît din părţile superioare ale tulpinii, cît şi din frunze, după metoda Ogur-Rosen [41]. În extractele perclorice s-au dozat AN prin determinări de pentoze şi fosfor după metodele amintite mai sus.

Cercetarea pe plante întregi a fost efectuată pe tomate soiul Pomodoro, în vîrstă de 35 de zile, cu înălțimea de 20—25 cm. Pe tulpina fiecărei plante s-au montat cîte două tuburi capilare [40]; unul sub prima frunză, celălalt aproximativ la 10—15 cm sub vîrf. Străpungerea tulpinii cu fitilul tubului de la vîrf s-a efectuat perpendicular pe direcția fitilului tubului de la bază, pentru ca să fie atinse cît mai multe vase conducătoare. Plantele au fost tratate timp de 6 zile cu soluții extrase din semințe încolțite de tutun (*d*), în care timp au absorbit între 5 și 6 ml de soluție. Experiențele au fost însoțite de probe martor (tratate cu apă și netratate). După tratament, ADN a fost extras separat atît din frunze, cît și din tulpini, cu soluție de acid percloric [41]. În extractele perclorice s-au dozat: dezoxiriboza în extractul ca atare, bazele în extract, după prealabilă diluare 1 : 4; fosforul în extract de 4 ml, adus la 25 ml după mineralizarea cu acid percloric 60%.

După cum reiese din datele obținute (tabela nr. 4), valorile celor trei componente ale AN (pentoze, baze și fosfor) sînt mai ridicate la tulpinile și la frunzele plantelor la care s-a introdus ADN decît la plantele martor. Valorile obținute la plantele tratate cu apă se situează între

Tabela nr. 4

Rezultate obținute pe plante întregi: conținutul în ADN al tulpinilor și frunzelor de tomate netrate (martor), tratate cu apă și tratate cu soluție de ADN extras din semințe încolțite de tutun Bel 61—10 (*d*), exprimat în densități optice. Citiri la fotocolorimetrul Pulfrich, la 600 mμ, cuva 1 000 (pentoze, fosfor); la spectrofotometrul VSU 1, la 260 m , cuva 1 000 (baze); valorile reprezintă media a cîte trei determinări

Proba		Martor	H_2O	ADN
Pentoze	Frunze	0,31	0,38	0,43
	Tulpini	0,07	0,15	0,31
Baze	Frunze	1,00	0,92	1,12
	Tulpini	0,23	0,33	0,48
Fosfor	Frunze	0,65	0,75	0,80
	Tulpini	0,14	0,23	0,23

cele ale plantelor martor și cele ale plantelor tratate cu ADN. Se mai constată că atît la variantele tratate, cît și la martor valorile obținute pentru cele trei componente ale ADN sînt mai ridicate în frunze decît în tulpini.

O altă serie de experiențe a fost efectuată pe plante de tomate din soiul Zeelandia, în vîrstă de 60 de zile, cu înălțimea de 25—30 cm, care au fost în prealabil despicate după procedeul elaborat la noi [38], [39]. Pe una dintre jumătățile de tulpină, sub prima frunză, a fost montat tubul capilar, cealaltă jumătate fiind considerată martor. Lotul de plante (6 bucăți) a fost împărțit în două: primul lot a fost tratat cu soluție 0,2% ARN (a) timp de 5 zile. În acest interval de timp, plantele au absorbit între 2,5 și 3,2 ml de soluție. După întreruperea tratamentului, din fiecare jumătate de tulpină (exceptînd prima porțiune de 1 cm de la locul de introducere a fitilului), precum și separat din frunzele care aparțineau jumătăților de tulpină, s-a extras acidul ribonucleic după metoda Ogur-Rosen [41]. Al doilea lot a fost tratat cu soluție 0,1% de ARN din drojdie (*a*) timp de 4 zile, în care timp plantele

au absorbit între 4,0 şi 5,0 ml. După întreruperea tratamentului, jumătăţile de tulpină erau secţionate în cîte trei porţiuni (*B* = bază, *M* = mijloc, *V* = vîrf), fiecare porţiune fiind supusă extracţiei de ARN după aceeaşi metodă. Secţionarea tulpinii a avut drept scop urmărirea mai îndeaproape a translocării ARN introdus de-a lungul tulpinii.

În primul caz (tabela nr. 5), în care dozările de acizi nucleici au fost efectuate atît pe tulpini , cît şi pe frunze, constatăm că atît jumătăţile tratate ale tulpinilor, cît şi frunzele aparţinînd acestor ju-

Tabela nr. 5

Rezultatele obţinute pe plante despicate: conţinutul în ARN *(a)* al jumătăţilor de tulpini şi al frunzelor de tomate martor şi tratate cu soluţie 0,2% ARN *(a)* exprimat în densităţi optice. Citiri la fotocolorimetrul Pulfrich, la 600 mμ cuva 1 000 (pentoze); la spectrofotometrul VSU 1, la 260 mμ, cuva 1 000 (baze)

Proba		1		2		3	
		Martor	Tratat	Martor	Tratat	Martor	Tratat
Pentoze	Frunze	0,31	0,42	0,40	0,45	0,35	0,40
	Tulpini	0,30	0,35	0,28	0,32	0,35	0,45
Baze	Frunze	0,20	0,35	0,25	0,40	0,20	0,42
	Tulpini	0,82	1,20	0,84	1,00	0,80	1,10

mătăţi, prezintă cantităţi mai mari de AN, exprimaţi în pentoze şi baze, decît jumătăţile tulpinilor netratate, respectiv frunzele aparţinînd acestor jumătăţi. Deoarece aceste diferenţe între jumătăţile de tulpină netratate şi frunzele respective şi între jumătăţile de tulpină tratate şi frunzele respective se menţin în toate experienţele, credem că ele se datoresc AN exogen introdus în plantele respective.

În cazul al doilea (tabela nr. 6), cînd dozările de AN s-au efectuat pe porţiuni de tulpină (*B*, *M*, *V*), se constată de asemenea o cantitate

Tabela nr. 6

Rezultate obţinute pe plante despicate: conţinutul în ARN al jumătăţilor de tulpini (pe porţiuni: *B* = baza, *M* = mijloc, *V* = vîrf) de tomate martor şi tratate cu soluţie 0,1% ARN *(a)* exprimat în densităţi optice. Citiri la fotocolorimetrul Pulfrich, la 600 mμ, cuva 1 000 (pentoze); la spectrofotometrul VSU 1, la 260 mμ. cuva 1 000 (baze)

Proba		1		2		3	
		Martor	Tratat	Martor	Tratat	Martor	Tratat
Pentoze	*B*	0,47	0,74	0,45	0,85	0,38	0,65
	M	0,51	0,53	0,55	0,50	0,45	0,55
	V	0,50	0,73	0,42	0,95	0,42	0,68
Baze	*B*	0,22	0,71	0,32	0,55	0,50	0,75
	M	0,24	0,28	0,40	0,50	0,45	0,70
	V	0,25	0,38	0,35	0,60	0,40	0,80

mai mare de ARN la jumătăţile de tulpină tratate decît la martor. Observăm însă că la jumătatea de tulpină tratată repartizarea cantităţii de AN este neuniformă : astfel, în toate cazurile partea de mijloc a tulpinii prezintă valori mai mici, iar baza şi partea superioară valori mai mari şi foarte apropiate.

În fine, ultima parte a cercetării a fost efectuată pe plante la care a fost îndepărtată rădăcina şi a căror tulpină a fost introdusă în soluţia de acizi nucleici. Plantele tomate soiul Pomodoro, în vîrstă de 35 de zile, erau introduse, după îndepărtarea rădăcinii, într-un cilindru care conţinea 5 ml de soluţie de ADN extras din seminţe încolţite de tutun Bel 61—10 (*d*) căreia i se suprapunea o peliculă de ulei de parafină pentru împiedicarea evaporării. În paralel, alte plante erau lăsate să stea în aceleaşi condiţii în apă de robinet. După 24 de ore, plantele au absorbit 3 ml de soluţie de acid dezoxiribonucleic, respectiv 6 ml de apă. În frunzele plantelor celor două variante, ca şi în frunzele unor plante normale (cu rădăcină), s-au dozat ADN prin determinări de pentoze, baze şi fosfor, prin metodele amintite mai sus.

Rezultatele, consemnate în tabela nr. 7, demonstrează prezenţa unei cantităţi mai mari de ADN în frunzele plantelor introduse în soluţie de ADN decît în celelalte două cazuri. Dacă comparăm rezultatele acestei experienţe cu rezultatele obţinute în experienţa de introducere prin metoda capilară a soluţiei de ADN (*d*) şi a apei (tabela nr. 4), constatăm

Tabela nr. 7

Rezultate obţinute pe plante fără rădăcină : conţinutul în ADN al frunzelor de tomate menţinute în soluţie de ADN extras din seminţe încolţite de tutun Bel 61—10 (*d*) în apă şi martor, exprimat în densităţi optice. Citiri la fotocolorimetrul Pulfrich, la 600 mμ, cuva 1 000 (pentoze, fosfor) ; la spectrofotometrul VSU 1, la 260 mμ, cuva 1 000 (baze). Valorile reprezintă media a cîte trei determinări

Substanţa	Martor	H_2O	ADN
Pentoze	0,24	0,23	0,30
Baze	0,32	0,27	0,39
Fosfor	0,70	0,69	0,75

că în primul caz cantitatea de ADN care se pune în evidenţă în frunzele plantelor tratate cu ADN este mai mică faţă de martor decît în cazul experienţei efectuate pe plantele cu rădăcină. Desigur că o comparaţie între aceste două experienţe este greu de făcut, deoarece condiţiile de lucru sînt diferite. Totuşi, n-ar fi exclus ca rădăcinile să joace aici un anumit rol.

Cercetările efectuate pe plante au arătat deci că atît ARN din drojdie (*a*), cît şi ADN din seminţe de tutun (*d*), introduşi prin metoda capilară în partea inferioară a tulpinii de tomate, se translocă, putînd fi regăsiţi în părţile superioare ale tulpinii, precum şi frunze.

În ceea ce priveşte eventuala analogie între migrarea pe hîrtie cromatografică a AN utilizaţi de noi şi translocarea lor în plante de tomate, experienţele au dovedit că în cazul ARN această analogie există.

Faptul însă că ADN pe hîrtia cromatografică rămîne pe start, pe cînd în plante de tomate el se translocă, poate fi explicat admiţînd că, datorită acţiunii enzimatice, molecula este depolimerizată, şi astfel uşor translocată. În favoarea acestei presupuneri se pot aduce rezultatele cercetărilor efectuate de Pavlinova [43], care găseşte o cantitate mai mare de nucleotide în frunzele şi vasele conducătoare ale plantelor de sfeclă de zahăr decît în parenchimul peţiolului ; de asemenea cercetările lui Bendich [32], care au arătat că viteza de migrare pe hîrtia cromatografică a ADN este „o reflectare a structurii macromoleculare şi creşte cu degradarea moleculei".

CONCLUZII

În vederea introducerii soluţiilor de AN în plante prin metoda capilară şi a cercetării translocării lor prin vasele conducătoare, s-au efectuat o serie de experienţe pentru a se stabili modul în care are loc trecerea soluţiilor de AN prin fitilul de bumbac şi modul de migrare a lor pe hîrtie cromatografică.

Din rezultatele obţinute am constatat că soluţia de ARN extrasă din drojdia de bere (*a*), şi cea de acid dezoxiribonucleic extras din seminţele încolţite de tutun (*d*), trec prin fitilul de bumbac fără să-şi modifice concentraţia.

În ceea ce priveşte migrarea AN pe hîrtia cromatografică, experienţele noastre au arătat că ARN din drojdie migrează o dată cu frontul apei, pe cînd ADN din seminţe încolţite de tutun rămîn pe start atît în cazul irigării cu apă, cît şi în cazul utilizării soluţiei de $NaCl-NH_3$-fosfat de sodiu. Rezultatele noastre sînt în concordanţă cu unele date din literatură care au arătat că migrarea ARN pe hîrtie cromatografică este funcţie de solventul utilizat şi că viteza de migrare a ADN depinde de gradul de polimerizare a moleculei, şi anume este cu atît mai mare cu cît greutatea moleculară a acidului este mai mică.

Cercetînd introducerea prin metoda capilară şi translocarea ARN extras din drojdie şi a ADN extras din seminţe încolţite de tutun Bel 61—10 în plante de tomate din soiurile Zeelandia şi Pomodoro menţinute întregi sau despicate, cu rădăcină sau fără, am constatat că aceşti compuşi sînt translocaţi şi pot fi puşi în evidenţă atît în părţile superioare ale tulpinii, cît şi în frunze.

În legătură cu analogia dintre migrarea AN pe hîrtie cromatografică şi translocarea lor în plante, experienţele au dovedit că ARN se comportă diferit faţă de ADN : ARN migrează pe hîrtie cromatografică şi se translocă în plante de tomate, pe cînd ADN rămîne fixat pe start în cazul cromatografierii pe hîrtie, dar se translocă în plantele de tomate.

Mulţumim ing. M. Aniţia şi E. Ioan de la Institutul de cercetări alimentare pentru procurarea materialului vegetal.

Institutul de biochimie al Academiei
Republicii Socialiste România

Prezentat la redacţie la 8 decembrie 1965

BIBLIOGRAFIE

1. Y. Oota, S. Osawa, *Migration of "storage PNA" from cotyledon into growing organs of bean seed embryo*, Experientia, **10**, 254 (1954).
2. Y. Oota, K. Takata, *Changes in microsomal ribonucleoproteins in the time course of the germination stage as revealed by electrophoresis*, Physiologia Plantarum, **12**, 518 (1959).
3. Y. Oota, *RNA in developing plant cells*, Ann. Rev. Pl. Physiol., **15**, 17 (1964).
4. Z. Šormová, F. Šorm, *Über Veränderungen des Gehaltes an Ribonuclein — und Desoxyribonucleinsäuren in Organen der Saaterbse im Verlaufe der Entwicklung des Keimpflanzen*, Coll. Czech. Chem. Comm., **XXI**, 1 043 (1956).
5. L. Ledoux, R. Huart, *Nucleic acids and protein metabolism in barley seedlings. IV. Translocation of ribonucleic acids*, Biochim. biophys. acta, **61**, 185 (1962).
6. L. Ledoux, R. Huart, *Sur la possibilité d'un transfert d'acides ribo et DR et de protéines dans les embryons d'orge en croissance*, Arch. intern. physiol. et biochim., **69**, 598 (1961).
7. V. Martos, *Experimental data concerning effect of plant roots on aerial parts. IV. Inhibition of nucleic acid metabolism of roots*,Acta Biol. Acad. Sci. Ungar. ,**10**, 169 (1959).
8. Н. Д. Тарасенко, С. П. Коваленко, *О передвижении соединений типа нуклеиновых кислот по проводящей системе растений*, Пизиология растений, **9**, 245 (1962).
9. H. Ziegler, M. Kluge, *Die Nukleinsäure und ihre Bausteine im Siebröhrensaft von Robinia Pseudoaccacia L.*, Planta, **58**, 144 (1962).
10. C. A. Swanson, J. B. Whitney Jr., *Studies on the translocation of foliar applied P^{32} and other isotopes in bean plants*, Amer. J. Botany, **40**, 816 (1953).
11. O. Biddulph, *Translocation of inorganic solutes, în Plant Physiology*, sub redacția lui F. Steward, vol. 2, *Plants in relation to water and solutes*, Academic Press, New York, 1959, p. 553.
12. M. J. Bukovac, S. H. Wirrwer, *Absorbtion and mobility of foliar applied nutrients*, Plant Physiol., **32**, 5, 428 (1957).
13. W. Chorney, N. J. Scully, *An injection technique for efficient infiltration of compounds into plants*, Proc. intern. Botanic Congr., **2**, 70 (1959).
14. H. Wiebe, P. J. Kramer, *Translocation of radioactive isotopes from various regions of roots of barley seedlings*, Plant Physiol., **29**, *4*, 342 (1954).
15. I. M. Felber, *Direct introduction of chemical substances into herbaceous plants*, Science, **106**, 251 (1947).
16. E. G. Jaworski, S. C. Fang, V. H. Freed, *Studies in plant metabolism. V. The metabolism of radioactive 2—4 D in etiolated bean plants*, Plant Physiol., **30**, *3*, 272 (1953).
17. E. Macovschi, *Metoda capilară pentru introducerea compușilor chimici și compușilor biologici în corpul plantelor*, Comunic. Acad. R.P.R., **8**, 183 (1958).
18. E. Macovschi, O. Zaharia, L. Buzilă, *Asimilația azotatului de amoniu introdus în plante de tomate prin metoda capilară*, St. cerc. biochim., **2**, 17 (1959); Rev. chimie, **5**, 49 (1960).
19. S. Rădulescu, *Unele observații asupra acțiunii și comportării heteroauxinei introduse în plante*, St. cerc. biochim., **2**, 189 (1959).
20. V. Frunzeti, L. Botoșăneanu, S. Rădulescu, *Acțiunea dihidrofoliculinei și testosteronei asupra catalazei foliare și consumului de oxigen la tulpinile de Solanum lycopersicum și Anthirrhinum majus*, St. cerc. biochim., **4**, 357 (1961).
21. E. Macovschi, O. Zaharia, *Acțiunea prolinei asupra aminoacizilor și substanțelor proteice din floarea-soarelui*, St. cerc. biochim., **3**, 7 (1960).
22. V. Frunzeti, L. Buzilă, E. Ghinea, *Introducerea unor soluții în plante prin metoda capilară*, St. cerc. biochim., **2**, 286 (1959).
23. E. Macovschi, V. Frunzeti, L. Botoșăneanu, *Factorii fizico-chimici și metabolici în transportul substanțelor în plante*, St. cerc. biochim., **4**, 427 (1961).
24. E. Macovschi, V. Frunzeti, S. Rădulescu, *Migrarea pironinei și albastrului de metilen prin tulpini de balsamine și tomate*, St. cerc. biochim., **6**, 23 (1963).
25. G. Schumann, *Colchicineffekte an wachsenden Pflanzen*, Naturwiss., **20**, 474 (1962).
26. А. Н. Белозерский, Н И. Проскуряков, *Практическое руководство по биохимии растений*, Советская Наука, Москва, p. 220, 1956.

27. J. W. Lyttleton, G. B. Petersen, *The isolation of DRNA from plant tissues*, Biochim. biophys. acta, **80**, 391 (1964).
28. J. Marmur, *A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms*, J. Mol. Biol., **3**, 208 (1961).
29. Z. Dische, *Über einige neue charakteristische Farbreaktionen der Thymonucleinsäure und eine Mikromethode zur Bestimmung derselben in tierieschen Organen mit Hilfe dieser Reaktionen*, Mikrochemie, **8**, 4 (1930).
30. W. Mejbaum, *Über die Bestimmung kleiner Pentosemengen insbesondere in Derivaten der Adenylsäure*, Z. physiol. Chem., **258**, 117 (1939).
31. R. J. L. Allen, *The estimation of phosphorus*, Biochem. J., **34**, 858 (1940).
32. A. Bendich, H. S. Rosenkranz, *A correlation between the sedimentation coefficient of ADN and its paperchromatografic migration*, Arch. Biochim. Biophys., **94**, 417 (1961).
33. J. P. Ebel, G. Dirheimer, M. Jacoub, S. Mueller-Felter, *Séparation des acides ribonucléiques et des polyphosphates inorganiques. I. Essais de séparation par électrophorèse et par chromatographie*, Bull. Soc. Chim. Biol., **44**, 1 167 (1962).
34. P. Boulanger, J. Montreuil, *Étude sur les acides nucléiques. Chromatographie quantitative sur papier des ribonucléotides*, Bull. Soc. Chim. Biol., **33**, 784 (1951).
35. R. B. Hurlbert, H. Schmitz, A. F. Brumm, V. T. Potter, *Nucleotides metabolism. II. Chromatographic separation of acid solution nucleotides*, J. biol. Chem., **209**, 23 (1954).
36. W. Mathias, *Über ein papierchromatographisches Verfahren für Serienuntersuchungen in der Pflanzen Züchtung*, Der Züchter, **24**, H II/12 (1954).
37. C. Tamm, S. Shapiro, R. Lipshitz, E. Chargaff, *Distribution density of nucleotides within a deoxyribonucleic acid chain*, J. biol. Chem., **203**, 673 (1953).
38. E. Macovschi, L. Botoșăneanu, *Metoda despicării pentru cercetări biochimice comparative la plante*, St. cerc. biochim., **6**, 485 (1963).
39. L. Botoșăneanu, *Le fendage total des plantes en vue des recherches de biochimie comparative*, Rev. roum. Biochim., **2**, 279 (1965).
40. I. D. Poppoff, D. I. Gheorghiev, *Introducerea substanțelor în plante prin metoda capilară*, St. cerc. biochim., **7**, 19 (1964).
41. M. Ogur, G. Rosen, *The nucleic acids of plant tissues. I. The extraction and estimation of desoxypentose nucleic acid and pentose nucleic acid*, Arch. Biochim. Biophys., **25**, 262 (1950).
42. О. А. Павлинова, Т. П. Афанасиева, *Кислоторастворимые нуклеотиды и фосфорилированные сахара проводящих тканей сахарной свеклы*, Физиология растений, **9**, 133 (1962).

ST. CERC. BIOCHIM., 9, 2, 181–186 (1966)

STUDIU ELECTROFORETIC ŞI IMUNOCHIMIC AL EXTRACTULUI DE ŢESUT EXCITOCONDUCTOR CARDIAC *

C. REICHEL, ECATERINA LUKACS, EVA LAPOHOS, A. KAPUSI, E. MODY şi ŞT. SZABÓ

652.4

Rezumat — Proteinele solubile extrase din ţesutul contractil şi din sistemul excitoconductor al inimii de bou au fost separate în 7 fracţiuni prin electroforeză pe hîrtie şi în geloză. S-au pus în evidenţă deosebiri semnificative între cele două ţesuturi în ce priveşte reprezentarea cantitativă a unora dintre aceste fracţiuni. Cea mai caracteristică deosebire constă în reprezentarea procentuală mai mare în ţesutul nodal a fracţiunilor cu migrare rapidă.

Testarea imunoelectroforetică a extractelor faţă de antiserul iepurilor imunizaţi cu triturat de ţesut nodal a pus în evidenţă existenţa în acest ţesut a unor antigene care lipsesc din ţesutul contractil cardiac şi din serul sanguin. Liniile de precipitare corespunzătoare acestor antigene sînt prezente pe imunoelectroforegrama extractului de sistem excitoconductor, testat faţă de antiserul corespunzător, absorbit în prealabil cu extract de ţesut contractil cardiac.

În lucrări anterioare [6–8] am demonstrat că ţesutul sistemului excitoconductor cardiac dispune de particularităţi care, pe criterii antigenice, îl deosebesc de ţesutul contractil cardiac. Utilizînd o baterie de teste serologice (reacţia cantitativă de fixare a complementului, hemaglutinarea pasivă, anafilaxia cutanată pasivă, imunodifuziunea), am constatat că serul iepurilor şi al şobolanilor imunizaţi cu triturat de sistem excitoconductor bovin reacţionează mai pronunţat cu extractul acestui ţesut decît cu extractul preparat din elementele contractile ale muşchiului cardiac. Antiserurile epuizate cu extract de miocard rămîn active din punct de vedere imunologic faţă de extractul ţesutului nodal bovin şi dau reacţie pozitivă chiar cu extractul de sistem excitoconductor de cal. Aceste rezultate ne-au determinat să studiem compoziţia proteică a ţesutului nodal cu metode electroforetice, pentru a verifica dacă sistemul de conducere cardiac conţine într-adevăr proteine cu proprietăţi antigenice proprii.

---

* Comunicare prezentată la U.S.S.M., Filiala Mureş-Autonomă Maghiară, Secţia de fiziologie, în şedinţa din 19 martie 1965.

MATERIAL ŞI METODĂ

Extractele tisulare. Miocardul contractil a fost obţinut din peretele ventriculului sting, iar ţesutul nodal din nodul atrio-ventricular şi din fasciculul His de cord de bou. Ţesuturile au fost triturate cu un omogenizator electric, folosindu-se o soluţie clorurosodică izotonică. Raportul de extracţie a fost de o parte organ la două părţi soluţie fiziologică tamponată. Pentru electroforeză s-a întrebuinţat supernatantul trituratelor, obţinut printr-o centrifugare de 60 min la 5 000 t/min. Conţinutul în proteine al extractelor a fost determinat cu metoda Kingsley [5] şi a variat între 1,3 şi 1,7%. Aceste extracte au fost concentrate de 3 ori, prin ultrafiltrare, contra unei soluţii clorurosodice izotone.

Imunizarea. S-au amestecat volume egale de triturate tisulare şi adjuvant Freund, preparat după schema utilizată de noi în alte experienţe [9]. Cinci iepuri au fost imunizaţi cu triturat de ţesut nodal bovin, după următoarea schemă : ca doză iniţială, 1 ml de amestec antigenic, intramuscular, iar ulterior cîte 0,5 ml din acelaşi amestec, intradermic, în planta labelor, şi 3 ml de vaccin pertussis, conţinînd 2×10^9 germeni pe ml, injectaţi intramuscular. Tratamentul s-a continuat cu administrarea săptămînală, pe cale intradermică, a 0,5 ml de antigen. După 4—6 inoculări animalele au fost sacrificate prin exsanguinare.

Electroforeza pe hîrtie. S-a utilizat hîrtie Whatman nr. 1 ; s-a aplicat 0,1 ml de extract ; intensitatea curentului : 1 mA pe bandă, coloraţie cu fucsină Geigy, evaluare cu aparatul automat E.R.I.—10 Zeiss-Jena.

Electroforeza în geloză : agar Difco 1% în tampon veronal pH 8,6, puterea ionică 0,05, conţinînd 0,01% mertiolat ; gradient de potenţial de 12 V/cm, durata 4 ore, la temperatura camerei. Colorare cu Amidoschwarz 10 B.

Imunoelectroforeza (Grabar, [4]). După electroforeza în geloză a extractelor, în şanţul paralel cu linia de migrare a antigenelor s-a aplicat antiserul nediluat. Colorarea şi citirea rezultatelor s-au executat după 3—5 zile de incubare la temperatura camerei.

Epuizarea antiserurilor. O cantitate de 1 ml de antiser amestecat cu 0,1 ml de extract tisular s-a incubat timp de 1 oră la 38°C, apoi 2 ore la 4°C şi ulterior s-a centrifugat 1 oră la 6 000 t/min.

Analiza statistică a rezultatelor s-a efectuat după testul „t" al lui Student.

REZULTATE

Electroforeza pe hîrtie a pus în evidenţă cîte 7 fracţiuni proteice în ambele extracte. Electroforegrama extractelor de sistem excitoconductor bovin diferă de cele miocardice din punctul de vedere al reprezentării cantitative a unor fracţiuni. Astfel, fracţiunile I şi II, cu migrare mai rapidă spre anod, arată valori mai ridicate în extractele de ţesut nodal decît în cele de ţesut contractil cardiac. Reprezentarea procentuală a fracţiunilor III—VII, situate succesiv în urma celor două anterioare (I şi II), este în general mai mică în extractul din sistemul excitoconductor decît în cel din ţesutul contractil cardiac. Diferenţele sînt statistic semnificative în cazul fracţiunilor I, II, III, V şi VII (tabelul nr. I, fig. 1 şi 2).

Electroforeza în geloză a dat rezultate care corespund celor obţinute prin electroforeza pe hîrtie.

Tabelul nr. 1

Proteinograma extractelor de miocard. Electroforeză pe hîrtie. Mediile valorilor procentuale şi abaterile standard

Proba	Nr. exp.	Fracţiuni electroforetice proteice						
		I	II	III	IV	V	VI	VII
Ţesut miocardic contractil $\bar{x}_1$	10	10,8	8,12	8,85	25,29	27,42	13,40	6,08
Ţesut de sistem excitoconductor $\bar{x}_2$	8	27,99	12,8	5,13	20,03	18,39	11,78	3,88
Abaterile standard S_d		1,38	1,5	1,144	2,28	3,56	1,975	1,016
P		$<0,001$	$<0,01$	$<0,01$	$\approx 0,05$	$<0,05$	$> 0,4$	$<0,05$

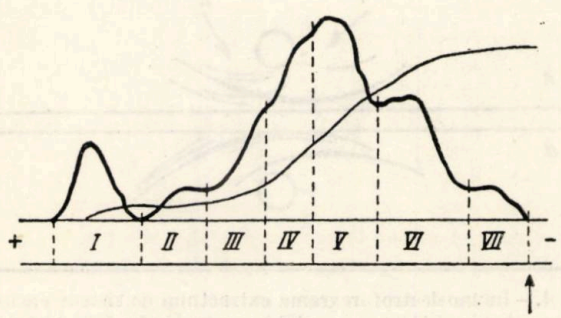


Fig. 1. — Electroforegrama pe hîrtie a unui extract de ţesut contractil de miocard bovin.

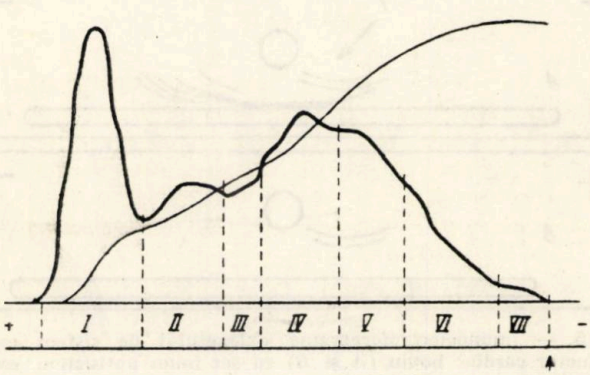


Fig. 2. — Electroforegrama pe hîrtie a unui extract de ţesut excitoconductor cardiac bovin.

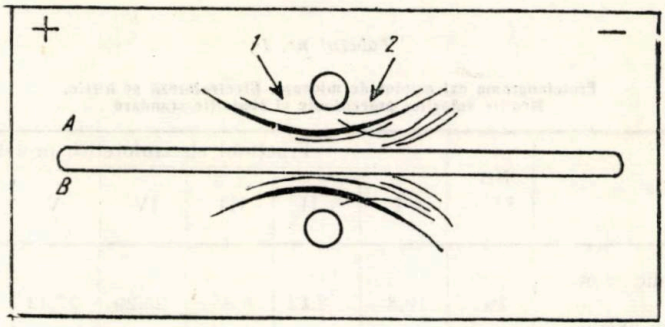


Fig. 3. — Imunoelectroforegrama extractului de sistem excitoconductor bovin (*A*) şi a extractului de miocard bovin (*B*) cu antiser faţă de extract excitoconductor cardiac bovin (şanţul median).

1 şi *2*: arcuri de precipitare caracteristice pentru sistemul de conducere.

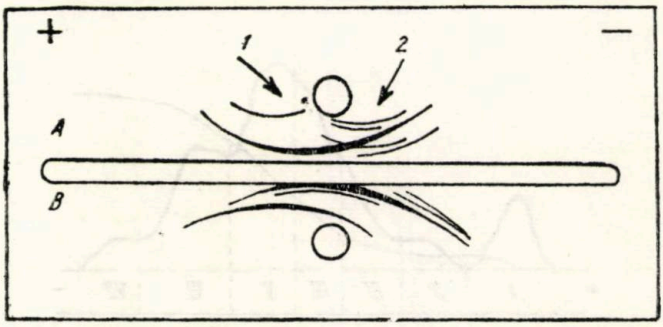


Fig. 4. — Imunoelectroforegrama extractului de sistem excitoconductor bovin (*A*) şi a serului sanguin bovin (*B*), testate faţă de ser imun antiextract de sistem excitoconductor bovin preparat pe iepure (şanţul median).

1 şi *2*: arcuri de precipitare caracteristice pentru sistemul de conducere.

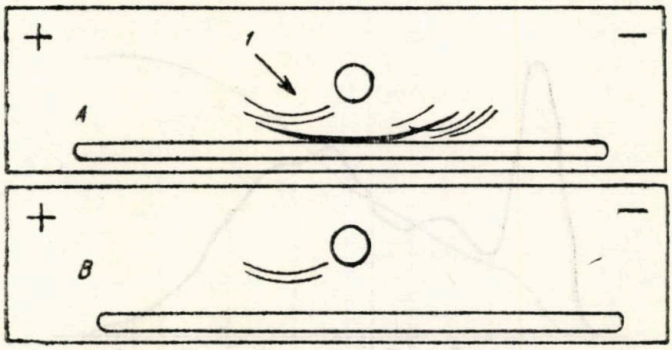


Fig. 5. — Imunoelectroforegrama extractului de sistem excitoconductor cardiac bovin (*A* şi *B*) cu ser imun antisistem excitoconductor bovin (şanţul de sus) şi cu acelaşi antiser absorbit cu extract de ţesut cardiac contractil (şanţul de jos).

1: arcurile de precipitare caracteristice pentru sistemul excitoconductor.

Imunoelectroforeza. Antiserurile obținute de la iepurii imunizați cu țesut nodal bovin au fost testate față de extractele țesutului respectiv, față de extracte de miocard bovin și față de ser sanguin bovin.

La testarea extractelor miocardice s-au obținut cîte un arc de precipitare pronunțat și mai multe arcuri subțiri. Antiserurile animalelor imunizate cu țesut nodal au dat o reacție de precipitare mai abundentă și arcuri mai multe cu extractul corespunzător decît cu extractul de țesut contractil (fig. 3). Astfel, pe imunoelectroforegrama extractului de țesut excitoconductor s-au obținut 2 linii de precipitare, care lipsesc în cazul extractelor de țesut contractil cardiac (fig. 3 și 4). Aceste două linii de precipitare au lipsit și atunci cînd serul antițesut nodal a fost testat cu serul sanguin de bou ca antigen (fig. 4). În cazul reacției dintre serurile antițesut nodal și extractul de țesut nodal, epuizate în prealabil cu miocard bovin, au apărut numai două linii de precipitare (fig. 5 *B*), ambele situate în zona marcată anterior cu *1* (antigenul diferențial *1*).

DISCUȚII

Rezultatele obținute prin electroforeza pe hîrtie și în geloză demonstrează că între țesutul contractil cardiac și cel nodal există deosebiri marcante în ceea ce privește reprezentarea proteinelor solubile, așa cum de altfel au semnalat Cruck [2] și Crepax și Parmeggiani [1]. În țesutul sistemului de conducere este procentual mai bine reprezentată proteina cu migrarea cea mai rapidă.

Imunoelectroforeza furnizează date privind deosebirile calitative dintre proteinele acestor țesuturi; aceste deosebiri se evidențiază în antigenitatea lor. Antiserurile furnizate de animalele imunizate cu țesut nodal bovin au dat mai multe linii de precipitare cu extractul corespunzător, dar au mai reacționat și cu extractul de țesut contractil cardiac și cu serul sanguin de bou. Liniile de precipitare obținute atît cu extractul de miocard, cît și cu cel de țesut nodal ori cu serul sanguin bovin, se datoresc antigenelor specifice pentru specie, prezente, probabil, în toate țesuturile și umorile. Liniile de precipitare care au apărut numai pe imunoelectroforegrama extractului de țesut nodal, lipsind din cîmpul electroforetic al extractului de țesut cardiac contractil și al serului sanguin bovin, corespund antigenelor prezente numai în sistemul excitoconductor; ele reprezintă antigene specifice, caracteristice țesutului nodal. Existența acestor antigene este atestată de faptul că serul antițesut nodal este capabil să reacționeze cu antigenul adecvat după epuizarea sa cu extract din țesut contractil cardiac, care, conținînd atît antigenele specifice pentru specie, cît și pe cele organospecifice, fixează anticorpii respectivi din antiser, rămînînd numai cei specifici pentru țesutul nodal. Rezultatele imunoelectroforetice confirmă deci datele obținute de noi cu procedeele serologice aplicate în cercetările precedente.

Considerăm că datele imunochimice prezentate în această lucrare pot contribui la explicarea unor aspecte ale afecțiunilor cardiace cu

caracter autoagresiv. Prezenţa antigenelor miocardice organospecifice în sistemul excitoconductor, demonstrată de Emmart şi Helander [3] şi confirmată în lucrările noastre anterioare, precum şi existenţa unor componente antigenice particulare ale acestui ţesut, fac posibilă participarea sistemului excitoconductor la procesele de autoagresiune pe cord, contribuind, de exemplu, la explicarea apariţiei tulburărilor de ritm, atît de frecvente în carditele reumatismale.

CONCLUZII

În repartiţia electroforetică a proteinelor solubile extrase din ţesutul sistemului excitoconductor cardiac bovin, fracţiunile cu migrare mai rapidă sînt procentual mai bogat reprezentate decît în ţesutul contractil.

Imunoelectroforegrama extractului de sistem excitoconductor prezintă arcuri de precipitare care corespund unor fracţiuni proteinice absente în miocardul contractil.

Rezultatele obţinute în prezenta lucrare confirmă constatările precedente ale autorilor, potrivit cărora sistemul de conducere cardiac conţine şi proteine cu caractere antigenice proprii.

Prezentată la redacţie
la 30 iunie 1965

*Baza de cercetări ştiinţifice din Tg.-Mureş
a Academiei Republicii Socialiste România
şi Catedra de fiziologie a I.M.F. Tg.-Mureş*

BIBLIOGRAFIE

1. Crepax P., Parmeggiani P. L., Arch. Sci. Biol. (Bologna), **40**, 423 (1956).
2. Cruck S., Arch. internat. Physiol., **65**, 1 (1957).
3. Emmart E. W., Helander E., Arch. Path. (Chicago), **70**, 730 (1960).
4. Grabar P., în *Methods of biochemical analysis*, vol. **7**, Interscience Publishers, Inc. New York, 1959, p. 7.
5. Kingsley G. R., J. biol. Chem., **133**, 731 (1940).
6. Lapohos E., Lukács E., Reichel C., Szabó Şt., Rev. Medicochir. Iaşi, *70*, 175 (1966).
7. Lukács E., Lapohos E., Reichel C., Szabó Şt., St. cerc. fiziol., **10**, 543 (1965).
8. Szabó St., Lukács E., Lapohos E., Reichel C., Kapusi A., Ztschr. Immunitätsforsch., **130** (1966).
9. Szabó Şt., Módy E., Székely I., Feszt T., Gyergyay F., St. cerc. fiziol., **9**, 359 (1964).

ST. CERC. BIOCHIM., 9, 2, 187–190 (1966)

CERCETAREA METABOLISMULUI PROTEIC ÎN NEUROZA GENERALĂ VEGETATIVĂ CU IOD-ALBUMINĂ MARCATĂ

S. POPESCU şi I. SZANTAY

578.539.17

Rezumat. — S-a studiat T/2 al HISA la 14 bolnavi cu neuroză generală vegetativă şi emaciere. Media T/2 plasmatic al HISA este scăzută la bolnavi faţă de martori, deşi eliminarea fecală este identică. Eliminarea ^{131}I în fecale, identică la neurotici şi normali, deosebeşte tulburarea metabolismului protidic din neuroze de cea din enteropatia exsudativă, ciroze etc.
Bilanţul pozitiv al azotului, aminoaciduria crescută, consumul mărit de oxigen, ca şi timpul de înjumătăţire al HISA, denotă fenomenul hipercatabolic din neuroză.

În lucrări anterioare, am arătat că neuroza generală se manifestă cu simptome corticovegetative şi de organ, adoptînd denumirea de neuroză generală viscerovegetativă [1].

Sînt cunoscute perturbările metabolismului general din neuroză [2]. Activitatea metabolică exagerată este documentată prin consumul de oxigen crescut [3] şi printr-un metabolism bazal extratiroidian ridicat [4].

Scăderea în greutate este una dintre manifestările clinice ale neurozei generale vegetative, care uneori, poate merge pînă la emaciere, evocînd sindromul de malignitate.

Birkmayer [5] găseşte slăbirea în 24% din cazuri pe un lot de 504 bolnavi de neuroză.

Plecînd de la ideea că în cadrul tulburărilor de metabolism care duc la slăbire poate exista şi o perturbare în metabolismul protidic, am căutat s-o documentăm cu ajutorul albuminei marcate cu ^{131}I.

MATERIAL ŞI METODĂ

Au fost selecţionaţi şi studiaţi 14 bolnavi de neuroză generală viscero-vegetativă care prezentau o scădere în greutate în medie de 8–10 kg. Aceşti bolnavi nu prezentau edeme şi aveau metabolism bazal extratiroidian de +10 pînă la +15%, cu frilozitate şi colesterol normal.

În mod deosebit s-a urmărit ca bolnavii să nu prezinte diaree şi nici eliminare de proteine prin urină sau scaun (Gregersen negativ), avînd un ficat funcţional normal.

De asemenea s-au exclus bolnavii cu hipertiroidism în baza metabolismului bazal foarte crescut, asociat tahicardiei de repaus şi sedativorezistenţă, cu transpiraţia mîinilor şi bulimie.

Bolnavii au fost menţinuţi la un regim dietetic echilibrat în proteine.

Lotului de 14 bolnavi cu neuroză, în comparaţie cu 4 normali, i s-a administrat HISA i.v., care reprezintă albumină marcată cu ^{131}I 100 μC_i, după o blocare prealabilă a tiroidei cu Lugol concentrat, timp de 3 zile.

S-a cercetat T/2 (timpul de înjumătăţire) al albuminei marcate prin recoltări discontinue de sînge pe heparină. După centrifugare, plasma este decantată şi uscată, apoi i se măsoară radioactivitatea cu un sistem de scintilaţie.

În paralel a fost urmărită eliminarea ^{131}I în fecale, care se recoltau riguros separat în 24 de ore, repetat timp de 5 zile. În acest mod s-a putut urmări eventuala deperdiţie intestinală a HISA, la nevoie putîndu-se înlătura cazurile de exsudaţie albuminoasă digestivă.

Concomitent, s-au cercetat proteinele totale şi electroforeza lor, bilanţul azotat, aminociduria şi eliminarea *17*-cetosteroizilor.

REZULTATE

Martorii au prezentat valori normale atît ale proteinelor totale, cît şi ale fracţiunilor electroforetice. De asemenea, bilanţul lor azotat (metoda Pregle-Parnas Wagner) este uşor pozitiv, în medie fixînd 1—4 g azot, şi în concordanţă de eliminare normală de 17-cetosteroizi urinari (în medie 8—10 mg în 24 de ore).

Aminoaciduria este normală, variind între 40 şi 180 mg în 24 de ore (reacţia cu ninhidrină).

Ne-am rezumat la 4 martori, deoarece datele noastre coincid cu cele din literatură.

Bolnavii cu neuroză generală vegetativă cu emaciere au prezentat o proteinemie totală la limita inferioară a normalului, în medie de 6,5 g%, cu o repartizare fiziologică a fracţiunilor. În schimb, bilanţul lor azotat este uşor negativ, eliminînd în medie cu 1—2 g azot peste cel ingerat, în concordanţă cu o eliminare scăzută de *17*-CS, ce variază între 2 şi 5 mg în 24 de ore [8], şi cu eliminare urinară de aminoacizi crescută, care a variat între 200 şi 300 mg în 24 de ore (tabela nr. 1).

Tabela nr. 1

Media unor date privind metabolismul protidic

Material	T/2	17 CS	Aminoaciduria	Bilanţ azotat
4 martor	14 zile	10 mg/24 de ore	102 mg/24 de ore	Pozitiv + 2,5 mg/24 de ore
14 neuroze	8 mg/24 de ore	4 mg/24 de ore	230 mg/24 de ore	Negativ — 1,5 g/24 de ore

Modificările albuminei marcate cu iod radioactiv au fost urmărite prin controlarea radioactivităţii plasmei recoltate la 2—24 de ore şi 2, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14 şi 16 zile de la administrare [6], [7]. Rezultatele au fost exprimate în impulsuri pe minut la ml de plasmă şi reprezentate în curbă semilogaritmică.

Curbele obţinute atît la martori, cît şi la bolnavi, au aceeaşi morfologie bifazică [9].

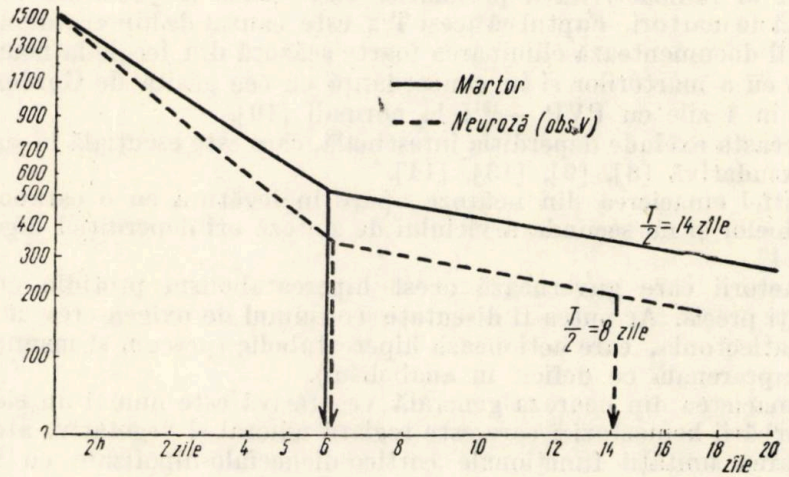


Fig. 1. — Timpul de înjumătăţire a albuminei marcate cu ^{131}I la martori normali şi la bolnavi de neuroză.

Faza albuminică care rezultă din amestecul albuminei marcate cu albumina marcată şi din ţesuturi este reprezentată printr-o treaptă ce coboară abrupt şi durează 4—5 zile.

Faza degradării este reprezentată în continuare de aceeaşi dreaptă, care are panta mai lină şi reprezintă albumina marcată înlocuită cu albumina nemarcată, adică utilizarea ei şi eliminarea iodului rezultat din degradarea HISA.

Faza albuminică la neurotici este uşor divergentă faţă de a normalilor, poate în relaţie cu capitalul protidic seric uşor scăzut la neurotici.

Faza degradării adînceşte divergenţa, arătînd o descreştere mai rapidă la neurotici cu T/2 variabil de 6, 10 şi 12 zile, media 8 zile, faţă de normali care au T/2 de 14—16 zile (fig. 1).

Radioactivitatea fecalelor este aceeaşi atît la normali, cît şi la neurotici, fiind în general o curbă joasă paralelă cu ordonata şi care indică o eliminare normală de 0,2—1% după 5 zile [10], [11].

Eliminarea urinară urmărită timp de 5 zile la 3 neurotici arată un ritm rapid, de 30—36% din iodul administrat.

DISCUŢII

Din cercetările comparative pe martori şi neurotici cu emaciere rezultă un catabolism accentuat al proteinelor la cei din urmă.

Acest catabolism proteic este indicat de bilanţul negativ al azotului şi de aminoaciduria crescută din neuroză.

Documentarea precisă este adusă prin studiul degradării HISA după administrarea intravenoasă [1], [12], [13].

T/2 al radioactivităţii plasmatice este redus la jumătate în neuroze faţă de martori. Faptul că acest T/2 este cauzat de hipercatabolismul proteic îl documentează eliminarea foarte scăzută din fecale la neurotici, similară cu a martorilor şi în concordanţă cu cea găsită de Gordon, 1— —1,5% în 4 zile cu PVP —^{131}I la normali [10].

Aceasta exclude deperdiţia intestinală, care este esenţială în enteropatia exsudativă [8], [9], [13], [14].

Astfel emacierea din neuroze apare în legătură cu o catabolizare a proteinelor şi nu secundară viciului de sinteză ori deperdiţiei digestive [13], [14].

Factorii care guvernează acest hipercatabolism protidic nu sînt cunoscuţi precis. Ar putea fi discutate consumul de oxigen crescut şi hipersimpaticotonia, care acţionează hipercatabolic (precum şi insuficienţa corticosuprarenală cu deficit în anabolism).

Emacierea din neuroza generală vegetativă este numai un element al perturbării hemostaziei care este reglată umoral şi vegetativ, atestînd perturbarea unităţii funcţionale cortico-diencefalo-hipofizare cu întreg organismul.

I.M.F. — Cluj, Clinica a III-a medicală

Prezentată la redacţie la 4 ianuarie 1966

BIBLIOGRAFIE

1. O. Fodor, Z. Baciu, *Cercetări asupra neurozei generale cu manifestări viscerale vegetative. Nota 1*, Bul. Ştiinţ. Acad. R.P.R., **4** (1958).
2. A. Moga şi colab., *Tulburările metabolice în neuroze*, Rev. med. chir. Iaşi, **3** (1956).
3. O. Fodor, Z. Baciu, *Cercetări asupra neurozei generale*. Nota 2, Bul. Ştiinţ. Acad. R.P.R., **4** (1958).
4. M. Perrault, B. Klotz, *Les faux Basedow*, Sem. Hôp., **34**, 2 730 (1958).
5. V. Birkmayer, *Clinique et thérapeutique de l'épanouissement neuro-végétatif*, Symposion Ciba, vol. V, nr. 3, 1957.
6. R. S. Cordon, *Exudative enteropathy. Abnormal permeability of the Gastrointestinal Tract demonstrable with labelled Polyxinilpyrolidone*, Lancet, **1**, 7 068, 525 (1959).
7. G. L. Lewallen şi colab., *Studies of iodoalbumin metabolism*. J. Clin. Invest., **66**, 68 (1959).
8. M. Bariety, A. Gaydes, *Hypoprotéinémie idiopathique*, Presse méd., **24**, 965 (1959).
9. M. Schwartz, S. Jarnum, *Gastrointestinal protéin loss in idiopathic (hypercatabolic) hypoproteinaemia*, Lancet, **1**, 327 (1959).
10. R. Cattan şi colab., *Hypoprotéinémie idiopathique*, Rev. int. d'Hép., **1**, 35 (1957).
11. E. Ullber şi collab., *The role of the gastrointestinal tract*, **167**, 421 (1960).
12. J. Albright, Trans. An. Amer. Phys., **62**, 204 (1949).
13. S. Nussle şi colab., *Déperdition intestinale de protéines plasmatiques chez l'enfant*, Helv. paed. acta, suppl. X, **16**, *5/6* (1962).
14. G. Martini, *Exudative enteropathia*, Dtsch. med. Wschr., **15**, 586 (1960).

ST. CERC. BIOCHIM., 9, 2, 191–195 (1966)

NOTĂ DE LABORATOR

METODĂ COLORIMETRICĂ RAPIDĂ DE DOZARE A GRUPĂRILOR AMINICE LIBERE ÎN PRODUSELE BIOLOGICE

EUG. PĂUNESCU

612.398.192–07

Rezumat. — Pentru aprecierea concentrației globale de aminoacizi dintr-un produs biologic se preconizează utilizarea unui reactiv cu ninhidrină (1 g) în etanol (250 ml) și acid acetic (2 ml). Reacția se practică în mediu tamponat (pH 7,2, tampon fosfat 0,2 M), folosind ca stabilizator al culorii dezvoltate o soluție apoasă 1 % de sare disodică de etilen-diamino-tetra-acetat.
Prezența ureei, guanidelor, purinelor și amidelor nu influențează rezultatele determinării. Triptofanul este evidențiat în proporție de 77–82 %.
Datorită rapidității de execuție, simplității și sensibilității corespunzătoare, metoda poate fi utilizată cu bune rezultate în cazul investigațiilor biochimice clinice.

Determinarea concentrației în aminoacizi a unui produs biologic constituie una dintre investigațiile ades utilizate pentru aprecierea desfășurării funcțiilor metabolice în general, și a metabolismului proteic în special.

În clinica umană, tulburările de metabolism, cu atingerea anabolismului sau catabolismului proteic, au repercusiuni directe asupra conținutului în aminoacizi al sîngelui și urinii. În serul sanguin, în afara creșterilor fiziologice datorite ingestiei de alimente, valori crescute peste normal ale conținutului în aminoacizi se constată în leziunile hepatice supraacute (intoxicații cu ciuperci, fosfor, cupru, mercur, cloroform etc.) și în alte cazuri de tulburare a anabolismului proteic (toxicoza sugarilor), în degenerescența hepato-lenticulară (maladia lui Wilson) și în toate cazurile ce se însoțesc de citoliză și de catabolism proteic accentuat (postoperator, după intervențiile mari; după traumatisme sau arsuri întinse; după iradierile masive, ca urmare a efectelor radiobiologice etc.). În schimb, cirozele hepatice (decompensate sau nu), ca și unele come hepatice și în special hemoragice, se însoțesc de hipoaminoacidemie.

Aprecierea concentrației în aminoacizi a unui preparat biologic se face prin *determinarea grupărilor aminice libere* conținute în acest produs, indiferent dacă este vorba de o tehnică volumetrică (metoda formol-titrimetrică Sörensen [1], metoda iodometrică cu complecși cuprici Pope-Stevens [2] sau Malangeau [3]), de o tehnică colorimetrică (cu β-naftochinon-sulfonat după Folin și Kravel [4], [5], cu ninhidrină [6], cu acid fosfotungstic [7]) sau de o

tehnică gazometrică (determinarea N liberat în prezență de acid nitros sau determinarea CO_2 liberat în prezență de ninhidrină [8]).

Sensibilitatea diferitelor tehnici de dozare a grupărilor aminice libere este variată. Astfel, metoda formol-titrimetrică este mult limitată de puterea tamponată a mediului, de zona largă de viraj a indicatorului și de prezența amidelor (uree), purinelor etc. Metoda complecșilor cuprici este limitată de faptul că o serie de aminoacizi (cistina, metionina, triptofanul, leucina și fenil-alanina) dau complecși cuprici greu solubili, și astfel dificil de apreciat iodometric. Metodele

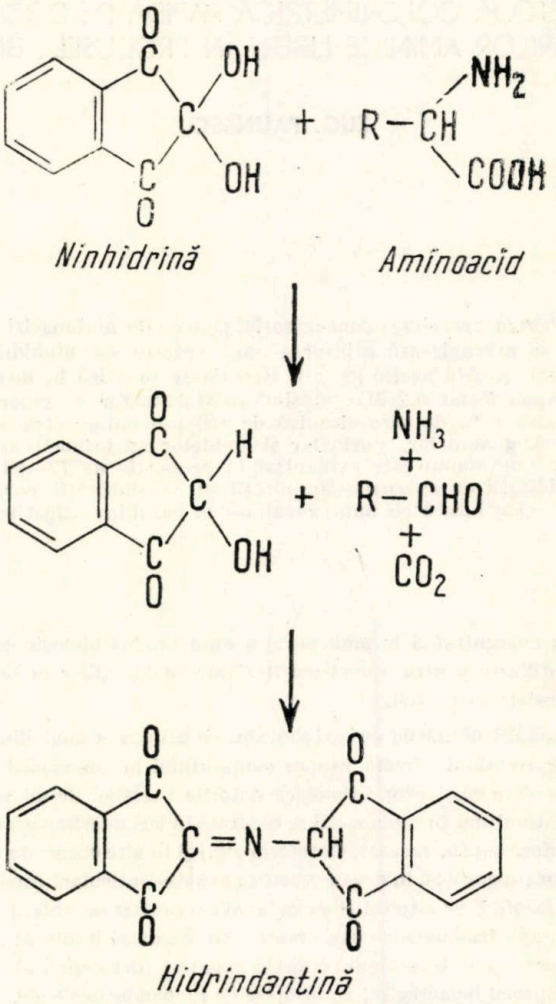


Fig. 1. — Reacția dintre ninhidrină și aminoacizi.

colorimetrice, pe de altă parte, pun în evidență și unele grupări aminice legate de purine, guanidine, amide (ureea) etc. sau sînt lipsite de sensibilitate pentru unii aminoacizi (triptofanul în cazul reacției la ninhidrină spre exemplu).

Dintre metodele de dozare a N-aminic în prezent folosite, există totuşi două care prezintă o sensibilitate şi o specificitate satisfăcătoare: metoda van Slyke [8] de măsurare a cantităţii de CO_2 liberat de aminoacizi sub acţiunea ninhidrinei şi metoda colorimetrică Folin, modificată de Kravel [5], care determină intensitatea culorii dezvoltate de aminoacizi în prezenţa β-naftochinon-sulfonatului, în mediu alcalin.

Ambele aceste metode prezintă însă dezavantajul de a fi pretenţioase, laborioase şi costisitoare, ceea ce — pentru practica clinică — constituie limitări importante.

Pornind de la aceste considerente, am încercat punerea la punct a unei tehnici simple, expeditive, puţin costisitoare şi satisfăcător de sensibilă, care să permită aprecierea concentraţiei de N-aminic în produsele biologice.

În acest scop, am considerat că o tehnică colorimetrică ar fi cea mai corespunzătoare şi — dintre reactivii cunoscuţi — am preferat ninhidrina, pentru mai marea sa accesibilitate (fiind utilizată şi în cromatografie) şi pentru reactivitatea sa accentuată (fig. 1).

Determinările aminoacizilor totali, efectuate cu ajutorul reactivului cu ninhidrină după tehnica bine cunoscută a lui Yemm şi Cocking [6], prezintă o serie de limitări. Aceste limitări constau în special din: *a*) oxidarea foarte rapidă a hidrindantinei (rezultată din reacţia dintre aminoacid şi ninhidrină, schematizată în fig. 1), ceea ce are ca rezultat rapida decolorare a sistemului de reacţie; *b*) reacţii insuficient de sensibile cu unii aminoacizi (triptofanul, lizina, prolina) sau nespecifice cu alte substanţe (guanide, purine, uree).

Pentru eliminarea acestor limitări, am schimbat compoziţia reactivului şi condiţiile de reacţie, ajungînd la o modificare importantă a tehnicii. În cele ce urmează, prezentăm rezultatele acestor investigaţii, concretizate într-o nouă tehnică, care are pe de o parte avantajul de a fi simplă şi rapidă, iar pe de altă parte este mai sensibilă.

REACTIVII

Întrucît oxidarea hidrindantinei formată în cursul reacţiei ninhidrină-aminoacid este deosebit de accentuată în mediu acid şi la temperatura de 100°C, necesară realizării reacţiei, am utilizat condiţii mai blînde de reacţie, reducînd aciditatea reactivului şi, concomitent, folosind în sistemul de reacţie un amestec tamponat. În acelaşi scop, după efectuarea reacţiei adăugăm ca stabilizator EDTA (puternic reducător).

1) Reactivul cu ninhidrină folosit are următoarea compoziţie:

Ninhidrină (Chinoin — Budapesta)	1 g
Alcool etilic 96%	250 ml
Acid acetic glacial	2 ml

Reactivul se poate păstra în sticlă brună, cu dop rodat, timp de cîteva luni.

2) Soluţia tampon folosită este un tampon fosfat 0,2 M, pH 7,2, după Sörensen [9]. Tamponul se poate păstra mult timp în sticlă bine închisă, după ce i s-au adăugat aproximativ 10 ml de cloroform la 1 000 ml de soluţie tampon.

3) Soluţia stabilizatoare se prepară extemporaneu, în cantitatea necesară pentru determinările din ziua respectivă. Compoziţia stabilizatorului este soluţie apoasă 1% de etilendiamino-tetra-acetat, sare disodică (versenat disodic).

4) Alcool etilic 96 %.

TEHNICA REACŢIEI

O cantitate din proba de cercetat care să conţină între 15 şi 100 gamma N-aminic se diluează la 1 ml. Se adaugă 3 ml de soluţie tampon (*2*) şi 1 ml de reactiv cu ninhidrină (*1*). În paralel, se face un *martor*, care conţine 1 ml de apă distilată, în locul probei diluate la 1 ml.

Tuburile de reacție și martorul se introduc apoi în baie cu apă clocotindă, unde se țin exact 7 min.

Imediat după aceasta, tuburile se răcesc rapid la apă de robinet și se adaugă în fiecare cîte 0,1 ml din soluția stabilizatoare (*3*). După agitare, se adaugă 5 ml de alcool etilic 96% (*4*). Se agită insistent și se filtrează printr-o hîrtie de filtru cu porozitate obișnuită (diametrul hîrtiei, 6 cm).

Filtratul probei se fotometrează contra filtratului martor în cuvă de 5 mm, folosind filtrul galben S 57. Extincția citită la fotometru pentru fiecare probă se extrapolează pe dreapta etalon, construită inițial cu ajutorul unei soluții de aminoacid (alanină), folosindu-se concentrații între 15 gamma și 100 gamma N-aminic/ml.

Rezultatele se pot exprima în mg N-aminic conținuți în 100 ml de probă (nediluată).

SENSIBILITATEA REACȚIEI

În condițiile descrise, reactivul cu ninhidrină dovedește o sensibilitate apreciabilă. În acest sens, investigațiile suplimentare efectuate ne-au arătat că:

— culoarea dezvoltată în reacție nu-și modifică intensitatea timp de peste 5 ore de la dezvoltarea reacției;

— prezența ureei nu modifică rezultatele testării;

— prezența guanidelor și purinelor în concentrații foarte mari (1000 gamma/ml) nu realizează o intensificare a culorii decît cu 2—5 unități de extincție;

— lizina nu dă valori aberante, foarte probabil datorită faptului că — în condițiile de reacție descrise — nu are loc reacția cu gruparea aminică din poziția ω;

— chiar triptofanul, care cu tehnica Yemm-Cocking dă reacții net incomplete, în cazul metodei descrise dezvoltă o culoare a cărei intensitate pe mg N-aminic este cu numai 18—23% mai redusă.

Apare totuși necesar și în cazul metodei descrise în această notă să se efectueze investigații suplimentare, în vederea evidențierii concentrației de triptofan, atunci cînd există bănuiala unei modificări care interesează direct acest aminoacid*.

APLICAREA METODEI LA DETERMINAREA CONCENTRAȚIEI SERICE ÎN AMINOACIZI

În cazul determinărilor efectuate pe serul sanguin, este necesară o deproteinizare anterioară a probei. În acest scop, este indicat ca deproteinizarea să se facă cu ajutorul alcoolului, deoarece se evită creșterea acidității (favorabilă oxidării hidrindantinei), care se obține în cazul defecării cu acid tungstic sau tricloracetic.

Practic, într-un tub conic de centrifugă se introduc 0,5 ml de ser, se adaugă 2,5 ml de alcool etilic 96%, se agită bine și se centrifughează 10 min la 3 500 t/min. Din supernatant se ia 1 ml (rareori este nevoie de 1,5 ml) și se introduce în tubul de reacție. Se completează volumul la 4 ml cu tampon fosfat, se adaugă 1 ml de reactiv cu ninhidrină și se continuă operațiile conform metodei descrise.

La calcularea valorilor (în mg/N-aminic) se va ține seama de diluția serului (1/6), efectuată cu ocazia deproteinizării.

---

* Identificarea și dozarea triptofanului se poate face, în condiții satisfăcătoare, cu ajutorul reactivului Ehrlich, după metoda Bates [9].

Pe 24 de seruri normale cercetate cu ajutorul acestei metode, valorile obţinute pentru aminoacizi au fost între 3,7 şi 5,4 mg N-aminic la 100 ml de ser, ceea ce se încadrează în limitele generale ale normalului (3,5—5,5 mg N-aminic la 100 ml de ser) stabilite prin celelalte metode.

CONCLUZII

Utilizarea unui reactiv alcoolic cu ninhidrină în mediu neutru tamponat şi folosirea unui stabilizator al culorii (EDTA) permit aprecierea concentraţiei globale de aminoacizi dintr-un produs biologic cu suficientă sensibilitate.

Prezenţa ureei, guanidelor, purinelor şi amidelor nu influenţează rezultatele determinării. Triptofanul este evidenţiat numai în proporţie de 77—82%.

Datorită rapidităţii de execuţie, simplităţii şi sensibilităţii corespunzătoare, metoda poate fi utilizată cu bune rezultate în cazul investigaţiilor biochimice clinice.

Prezentată la redacţie
la 30 decembrie 1965

Laboratorul de biochimie şi fiziologie bacteriană
al Institutului clinic de ftiziologie,
Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. S. P. Sörensen, Biochem. Z., p. 745 (1907).
2. C. G. Pope, M. F. Stevens, Biochem. J., **33**, 1 070 (1939).
3. P. Malangeau, R. Bourdon, A. M. Nicaise, B. Masson, Ann. Biol. Clin., **21**, 1 (1963).
4. O. Folin, J. biol. chem., **5**, 377 (1922).
5. W. Kravel, J. Lab. Clin. Med., **29**, 122 (1944).
6. E. W. Yemm, E. C. Cocking, Analyst, **81**, 970 (1955).
7. J. Antener, Schweiz. med. Wschr., **83**, 425 (1953).
8. D. Van Slyke, D. Dillon, Proc. Soc. exp. Biol., **34**, 362 (1936).
9. P. Georgescu, E. Păunescu, *Metode biochimice de diagnostic şi cercetare*, Edit. medicală, Bucureşti, 1960, p. 21 şi 355.

ST. CERC. BIOCHIM., 9, 2, 197–205 (1966)

REFERATE GENERALE

FRACȚIUNILE SUBCELULARE ÎN METABOLISMUL MEDICAMENTELOR

I. MANTA

615.7

Organul cu deosebit rol în metabolismul medicamentelor este ficatul. La acest nivel, medicamentele pot suferi uneori un proces de activare. Un exemplu în acest sens îl constituie prontosilul, care este inactiv *in vitro*, dar cu proprietăți bacteriostatice *in vivo*, datorită scindării legăturii azo- și eliberării sulfanilamidei active. La fel, parationul își manifestă acțiunea anticolinesterazică după convertirea la paraoxon la nivelul ficatului.

Termenul general de „biotransformare" propus de autorii francezi cuprinde procesele de transformare a medicamentelor în care se include atît activarea, cît și alte feluri de transformări chimice.

Rolul deosebit al ficatului în metabolizarea medicamentelor se datorește aparatului său enzimatic complex, capabil de numeroase reacții chimice. În cazul suferinței ficatului, administrarea unor medicamente devine periculoasă, dacă doza terapeutică nu este stabilită în funcție de capacitatea sa metabolică.

Butler a calculat că, fără transformările enzimatice din ficat, timpul de înjumătățire a alcoolului ar fi de 24 de zile [8]. Ficatul peștilor și al amfibiilor nu conține enzime capabile să metabolizeze medicamentele. Astfel, ficatul de pește conține cantități foarte mici de glicuronil-transferază, iar insectele și artropodele acvatice conjugă fenolii cu glicozizii și nu cu glicuronizii. La aceste clase, drogurile difuzează prin piele în mediul înconjurător. În schimb, ficatul crustaceelor este capabil să metabolizeze medicamentele [6].

Sistemele enzimatice implicate în biotransformări nu sînt aceleași, cum s-a crezut multă vreme, cu cele care intervin în metabolismul intermediar. Acestea din urmă sînt specifice și joacă un rol definit într-un lanț de reacții perfect canalizate. Din contră, enzimele de biotransformare, care se găsesc în microzomi, sînt puțin specifice și nu acționează asupra substraturilor fiziologice [3]. Este adevărat că în privința mecanismului unor reacții pot fi găsite analogii între modul de metabolizare a medicamentelor și a produșilor metabolismului intermediar. S-a arătat, de exemplu, că triptofanul, fenil-alanina, kinurenina, acidul antranilic, acidul fenil-acetic nu pot fi hidroxilați de enzimele microzomiale care hidroxilează compuși aromatici, ca: acetanilida, anilina acidul salicilic, naftalina [24]. Pe de altă parte, în experiențele lui Narasimhulu și Rosenthal [25] s-a arătat că adăugarea de acetanilidă la extractele microzomiale din ficat induce apariția unor modificări spectrale similare cu cele observate după adăugarea de hormoni steroizi la preparatele de microzomi din suprarenală.

Sînt cazuri în care substanţele exogene sînt totuşi metabolizate de enzimele „normale" ale celulei hepatice, ca alcool-dehidrogenaza, monoamin-oxidaza, esteraze, xantin-oxidaze [6]. De asemenea, o serie de substraturi endogene sînt metabolizate de un sistem mixt enzimatic microzomial care acţionează asupra medicamentelor.

ROLUL ENZIMELOR MICROZOMIALE ÎN METABOLIZAREA MEDICAMENTELOR

Un rol însemnat al enzimelor din sistemul microzomial este acela de a transforma compuşii străini, liposolubili, în derivaţi hidrosolubili, polari [27]. În acest fel, dintr-un produs toxic, greu excretabil de către rinichi, se ajunge la un derivat uşor eliminabil. Studiile întreprinse în această direcţie au arătat că, în general, metaboliţii drogurilor sînt mai polari decît compuşii iniţiali.

Sînt totuşi cazuri cînd metaboliţii drogurilor sînt mult mai toxici decît substanţa iniţială. În aceste situaţii am putea vorbi de toxifierea prin metabolizare [29] (tabelul nr. 1).

Sînt şi cazuri în care apare conversiunea metabolică a substanţelor străine din compuşi hidrosolubili în compuşi liposolubili, de exemplu în urma unor S, N şi O-metilări, dihidroxilări, deacetilări [28], [31]. Raţia de alchilare a barbituricelor şi anticonvulsivantelor de către microzomii de ficat nu depinde de solubilitatea lor în solvenţi organici. S-a sugerat că reacţii ca fosforilarea, carboxilarea au rolul de a preveni difuziunea din celulă a intermediarilor biosintetici vitali [15].

Tabelul nr. 1

Creşterea toxicităţii unor substanţe prin metabolizare (după Schuster [29])

Substanţa	*Metabolitul toxic rezultat*
Sulfanilamida	acetil-sulfanilamida
Etilen-glicolul	acidul oxalic
Metanolul	formaldehida
Fluoracetatul	flor-citratul
Parationul	paraoxona
Tremorina	oxitremorina
Dimetil-nitrozamina	diazometanul
Heptaclorul	heptaclor-epoxidul
Nitrobenzenul	nitrozobenzenul, fenil-hidroxilamina
Acet-anilida	anilina
Derivaţi ai As^{5+}	derivaţi ai As^{3+}
Seleniaţi	seleniţi
2-Naftil-amina	*2*-amino-*1*-naftolul
Codeina	morfina
Fenil-tioureea	hidrogenul sulfurat

Se admite că metabolizarea medicamentelor efectuată de microzomii hepatici are loc în prezenţă de NADH şi oxigen [7]. S-au izolat însă puţine enzime în stare pură şi rămîn necunoscuţi o serie de cofactori inhibitori, rolul deosebirilor de specie, nutriţie, mediu etc.

Microzomii izolaţi prin centrifugare diferenţială sînt fragmente de reticul endoplasmatic şi alte membrane rezultate în urma distrugerii celulei. Compoziţia chimică a acestor fragmente este destul de variabilă [30]. Enzimele de metabolizare a medicamentelor par să fie concentrate în particolele mai clare, care se află pe suprafaţa netedă a reticulului endoplasmatic al celulelor [17].

Pe lîngă greutățile de separare, apar și alte dificultăți în studiul enzimatic, deoarece metodele uzuale de solubilizare inactivează multe dintre enzimele de metabolizare a medicamentelor, după cum se vede din tabelul nr. 2 [29].

Imai și Sato [18] arată că activitatea anilin-hidroxilazei solubile, liofilizate, este complet inhibată prin extracție cu un amestec de etanol și eter, dar se reactivează prin adăugarea unui extract de lipide microzomiale. La fel se comportă și N-demetilaza solubilă. Esteraza microzomială izolată de Krisch [20] este o proteină omogenă, identică cu amidaza, amino-

Tabelul nr. 2

Unele enzime mitocondriale de metabolizare a medicamentelor (după Schuster [29]).

Enzima	Sursa	Metoda de solubilizare	Randament (%)
Anilin-hidroxilaza	ficat de iepure	venin de șarpe	95
Acet-anilid-hidroxilaza	ficat de porc	lipază pancreatică	50
Glicuronil-transferaza	ficat de iepure	venin de șarpe	30
Iminoacil-anilidaza	ficat de iepure	înghețare-dezghețare	30
		ultrasunete	90
Esteraza microzomială	ficat de porc	înghețare-dezghețare; extracție cu glicerină	14
Azoreductaza		venin de șarpe	
Nitroreductaza	ficat de iepure	lipază pancreatică	
N-demetilaza	ficat de șobolan	ultrasunete, colat	60
Amino-azo-N-demetilaza	ficat de șobolan	dezoxicolat	30

acid-esteraza, alil-esteraza, procain-esteraza din microzomi. Au fost descrise în reticulul endoplasmatic al diferitelor țesuturi oxidaze cu funcțiuni mixte, care catalizează reacțiile steroizilor, lipidelor, medicamentelor și ale altor compuși străini organismului (compuși xenobiotici).

S-a identificat o serie de componente redox: cit. b_5, sau în microzomii suprarenalei: cit. $_{559}$(bovin), NADH-cit. b_5 reductaza (o flavoproteină), NADH-diaforaze, NADH-cit. *c*-reductaza, o hemoproteină sensibilă la acțiunea CO (P 450), un component detectabil prin RES, Fe microzomial coenzima Q [23] (fig. 1).

În privința activității enzimatice, există diferențe de la o specie la alta, microzomii din ficatul de șobolan fiind mult mai activi decît cei din ficatul de iepure [21].

Rămîne neclarificat mecanismul activării oxigenului în microzomi. Ca exemplu de enzimă de activare a oxigenului se poate da reticulocromul, o hemoproteidă sensibilă la acțiunea CO, care intervine în hidroxilarea steroizilor [16] și a cărei structură depinde de integritatea microzomilor nativi. S-a descris o enzimă capabilă să hidroxileze anilina și hidrocarburile policiclice prin încorporarea în substrat a oxigenului atmosferic. Identificarea familiei de oxidaze nespecifice din microzomi s-a întreprins prin studii comparative și cu ajutorul inhibitorilor [11], [13]. Deoarece s-a detectat o singură grupare prostetică, s-a presupus că pluralitatea de substrat se datorește membranei lipoproteice bimoleculare legate de enzimă, care influențează geometria de prezentare a substratului la enzimă [23]. Astfel, N și *p*-hidroxilarea anilinei și N-etil-anilinei ca și dealchilarea N-etil-anilinei în microzomi, prezintă diferențe în privința afinității pentru oxigen. De asemenea puromicina, antibiotic care blochează transferul complexului aminoacid-sARN la proteina microzomială, inhibă complet inducția de către 3-metil-colantren și fenobarbital a oxidazelor nespecifice [12].

S-a constatat că activitatea sistemului microzomial crește foarte mult prin incubare cu oxigen în loc de aer [35], utilizarea unui amestec de NADH și NADPH [26] sau prin pretratarea animalelor cu compuși de tipul fenobarbitalului sau metil-colantrenului, uneori după administrare de tetraclorură de carbon, fenil-butazonă. O consecință practică este explicarea creșterii toleranței la barbiturice și antihistaminice atunci cînd acestea sînt administrate vreme îndelungată în combinație cu fenobarbitalul în tratamentul epilepsiei [14].

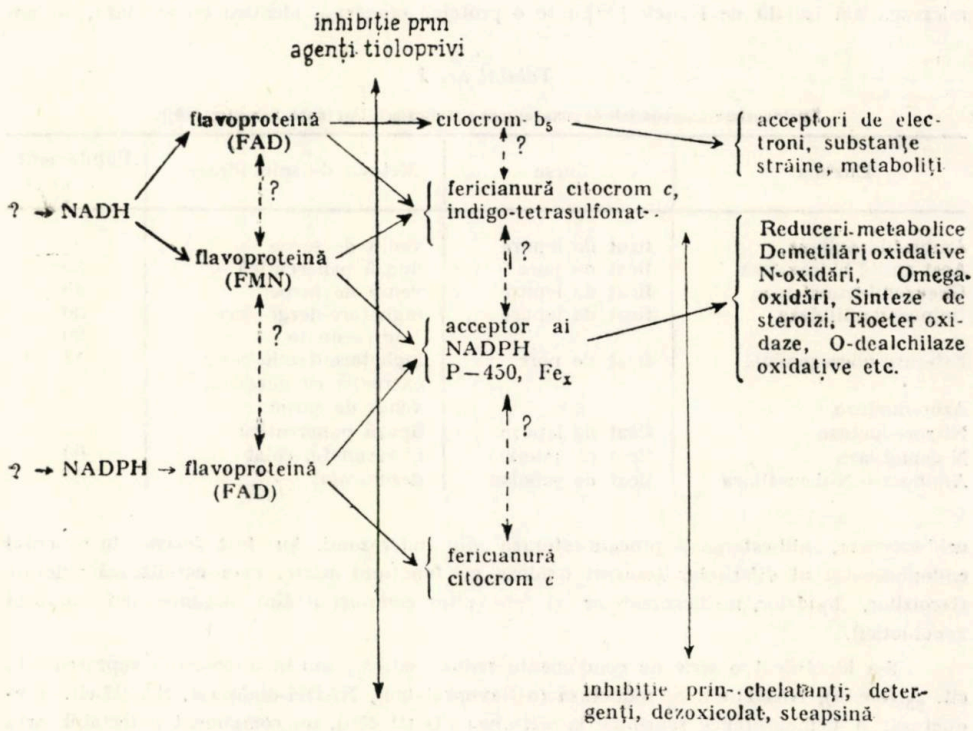


Fig. 1. — Organizarea componenților redox din microzomi (după Mason [23]).

Relația dintre creșterea metabolismului medicamentelor la animalele pretratate și sinteza indusă a proteinelor enzimatice este dovedită indirect. Astfel, etionina, care inhibă sinteza proteinelor prin reducerea cantității de ATP din ficat, împiedică inducția enzimelor microzomiale cu fenobarbital.

Experiențele lui Conney (citat după [33]) au evidențiat o interrelație interesantă între metabolismul medicamentelor și unele hidroxilări ale steroizilor. Pretratamentul cu fenobarbital sau cu hidrocarburi policiclice stimulează atît rata de oxidare a hexobarbitalului și amidopirinei, cît și capacitatea microzomilor de a hidroxila testosteronul, Δ 4-androsten, *3,17*-diona în pozițiile 2β, 6β și 16 α. Aceste date, corelate cu altele spectroscopice, permit să se presupună un mecanism comun în hidroxilarea steroizilor și a unor medicamente. Microzomii suprarenalei oxidează în condiții aerobe NADPH, rata oxidării crescînd prin adăugare de *17*-α-hidroxi-progesteron, iar CO nu afectează rata bazală, ci numai pe cea indusă de hormon. Modificările de spectru înregistrate la anumite lungimi de undă prezintă similitudini cu cele obținute prin tratarea microzomilor de ficat cu amidopirină ca substrat.

În clasa de enzime redox a mai fost descrisă o nitroreductază care catalizează reducerea FAD de către NADPH. FAD-redus poate, în condiții anoxibiotice, să reducă nitroderivații pe cale neenzimatică. Această observație explică de ce nitroreductaza microzomială este activă numai în condiții de anaerobioză și activitatea ei este stimulată de cantități mari de FAD. Kamm și Gillette sugerează că reducerea anoxibiotică a nitroderivaților și oxidarea oxibiotică a NADPH poate fi catalizată de același sistem enzimatic, probabil NADPH-cit. *c*-reductaza (citat după [29]).

Tot în cadrul reacțiilor redox se încadrează N-hidroxilarea, N-oxidarea, N-oxid-dearilarea efectuate de oxidazele cu funcții mixte din microzomi.

O reacție de o importanță deosebită este dehidrogenarea alcoolului și a acetaldehidei. Alcoolul format în cursul metabolizării unor medicamente nu reprezintă decît un stadiu intermediar al transformării (astfel, *n*-nitrotoluenul este transformat în alcool *p*-nitrobenzilic).

După Toki (citat după [29]), produsul inițial în oxidarea metil-hexabitalului de către sistemele microzomiale este un derivat *3*-hidroxilat. Acesta este apoi oxidat la un *3*-cetoderivat de către o enzimă solubilă, în prezența NAD sau NADP. Reacția este reversibilă și pare să fie catalizată de alcool-dehidrogenază (ADH), asemănătoare cu enzima care catalizează interconversiunea dintre *3*-ceto- și *3*-α-hidroxisteroizii din suprarenală în prezența NAD sau NADP. Aldehidele sînt oxidate la acizi carboxilici de cel puțin trei sisteme enzimatice: aldehid-dehidrogenaza (dependentă de NAD), xantinoxidaza și aldehidoxidaza. Prima catalizează oxidarea aldehidelor formate de către monoaminooxidază, pornind de la histamină, *5*-hidroxitriptamină, adrenalină sau noradrenalină. Oxidarea cloral-hidratului la acid tricloracetic este efectuată de un sistem enzimatic particular, prezent în ficat, care este inactiv față de un mare număr de alte aldehide (citat după [3]).

Un subiect de controversă este oxidarea metanolului. Majoritatea autorilor susțin că oxidarea la formaldehidă are loc în ficat, fiind inhibată competitiv de etanol, atît *in vivo*, cît și *in vitro*. Nu se știe dacă oxidarea metanolului este efectuată de ADH, catalază sau de ambele enzime. Controversele se datoresc și speciilor de animale utilizate, ca și din raportarea rezultatelor obținute pe omogenate față de animalul viu.

Tephly (citat după [29]) arată că oxidarea metanolului la șobolani poate să se datorească catalazei hepatice. Transformarea metanolului marcat la carbon în $^{14}CO_2$ este scăzută prin tratarea animalelor de experiență cu *3*-amino-azotriazol, inhibitor al catalazei hepatice [32]. De asemenea oxidarea metanolului (nu și a etanolului) s-a stimulat prin adăugare de glucoză + glucozooxidază la omogenate sau prin adăugare de xantină la felii de ficat. Aceste adaosuri generează apa oxigenată necesară oxidării metanolului de către catalază. Demn de semnalat este faptul că numai la om și la maimuțe întîlnim fenomene de intoxicare cu alcool metilic. Celelalte specii sînt mai sensibile la etanol decît la metanol.

CONJUGAREA

Un mare număr de substanțe străine organismului sau de produși de transformare ai acestora se conjugă cu unii constituenți ai celulei pentru a forma glicuronizi, esteri sulfurici, esteri fosforici, acizi mercapturici, glicocolconjugați sau compuși acetilați.

a) *Conjugarea cu glicocol* se produce în special la nivelul grupei carboxilice fixate la benzen, naftalen, tiofen, furan, piridină sau la nivelul grupei carboxilice separate de nucleul aromatic printr-o grupare vinilică. Exemplul tipic îl constituie formarea acidului hipuric pornind de la acid benzoic. Reacția are loc *in vitro* atît în aerobioză, cît și în anaerobioză (numai cu ATP în prezența CoA) [3].

b) *Glicuronoconjugarea* se produce la nivelul grupărilor hidroxilice ale aproape tuturor compușilor organici, cu excepția hidraților de carbon și a OH-ului hidroxilaminei. De asemenea are loc la nivelul carboxilului fixat de hidrocarburi aromatice sau pe carbonul terțiar al hidrocarburilor alifatice. După Bridges [5], N-glicuronidele nu se formează enzimatic, ci rezultă dintr-o reacție chimică între diferitele amine și acidul glicuronic. Totuși, s-a arătat o sinteză enzimatică a N-glicuronidelor de către microzomii de ficat care necesită UDPG [2].

c) *Formarea acizilor mercapturici* poate avea loc direct de la halogenuri aromatice, nitroderivați. Intermediarul activat în sinteza acizilor mercapturici din amine aromatice pare să fie un derivat N-hidroxilaminic care rezultă sub acțiunea sistemului microzomial în prezența NADPH și a oxigenului [9]. S-a izolat din ficat o enzimă solubilă care catalizează conjugarea halogenurilor aromatice sau a nitroderivaților, glutation-kinaza [1]. Conjugarea halogenurilor alifatice cu glutation este efectuată de o enzimă diferită, izolată din ficat și rinichi.

d) *Conjugarea cu sulfat.* Unii sulfați ai steroizilor sînt intermediari biosintetici, de exemplu conversiunea *in vivo* a pregnenolon-sulfatului (marcat cu ^{35}S) în dehidro-izoandrosteron-sulfat [10]. Compușii hidroxilați aromatici care nu sînt oxidați sînt conjugați sub forma esterilor acidului sulfuric, însă capacitatea de sulfoconjugare a organismului este limitată. Ionul sulfat este activat în prezența ATP-ului, cu formarea unui adenozin-*5*-fosfat, apoi este transferat pe acceptor de o sulfokinază [3].

e) *Conjugarea cu acid fosforic.* Excreția fenolilor sub forma de esteri fosforici este mai mică decît ca esteri sulfurici, deși în organism disponibilitatea de fosfat este mai mare. Un exemplu îl constituie excreția de *bis*-(*2*-aminonaftil)-hidrogen-fosfat după administrarea de 2-naftil-amină. Esterul fosforic nu este excretat de iepure, specie care nici nu formează tumori prin administrare de *2*-naftil-amină. Producerea substanței cancerigene a fost explicată prin trecerea în parte a esterului fosforic în *2*-amino-*1*-naftol.

f) *Acetilarea.* Conjugarea are loc în ficat și în splină și se efectuează pe compuși ca acidul *meta*- și *para*-aminobenzoic, unii acizi aminați, anilină. Necesită activarea prealabilă a grupării acetil sub forma de acetil-CoA.

g) *Desulfurarea.* Glanda tiroidă, spre deosebire de alte țesuturi, metabolizează tioureea, cu formarea unui complex proteic legat de sulf care trece apoi în tiosulfat sau SO_4^{2-}. Se presupune că proteina reactivă în desulfurarea tioureei joacă prin gruparea —S—S— un rol esențial în formarea complexului proteină-monoiod-tirozină. Dintre reacțiile de desulfurare prin sistemele microzomiale notăm : conversiunea fosforotionaților la fosfați, a fenil-tioureei la tiouree. Importanța acestei reacții este demonstrată de toxicitatea de 400 de ori mai mare a *1,3*-difenil-tioureei, care nu poate fi desulfurată [4].

h) *Metilarea.* Metil-transferazele nespecifice pot să metileze o serie de amine primare, secundare, endogene sau exogene. Ele sînt inhibate de clor-promazină. Remy obține din rinichi o enzimă care diferă de homocistein-transmetilază, capabilă de S-metilarea *2*-tiopirimidinei și *6*-tiopurinelor.

i) *Dealchilarea.* Sistemul microzomial din ficat poate demetila derivații S-metil ai barbituricelor, benzotiazolului, purinei, cisteinei, dar nu și metionina. Pretratamentul cu *3,4*-benzpiren crește activitatea enzimei de S-demetilare. Se pare că N-dealchilarea se efectuează pe calea N-hidroxilării, urmată de o rearanjare moleculară. În felul acesta se poate stabili o relație strînsă între N-dealchilare, N-hidroxilare și formarea N-oxizilor, care, probabil, apar ca intermediari în reacția de N-dealchilare.

N-demetilarea reprezintă la om calea majoră în metabolizarea histaminei. Toleranța la morfină este în legătură cu activitatea N-demetilazei.

Menționînd rezumativ principalele tipuri de reacții implicate în metabolizarea drogurilor, numărul și tipul lor nefiind limitat , există încă probleme neelucidate asupra relației dintre sistemele enzimatice „normale" și cele legate de metabolizarea medicamentelor.

Rolul altor formațiuni subcelulare. Mai puțin cercetat este rolul nucleului și al mitocondriilor în metabolizarea medicamentelor, deși se cunosc numeroase substanțe care acționează la acest nivel. Astfel, sînt decuplanți ai fosforilării oxidative sau inhibitori ai transferului de electroni în lanțul respirator. În această categorie intră tiroxina, dicumarolul, unii nitrofenoli, acidul hidroxiantranilic, acidul tiosalicilic, unele biguanide. Acțiunea acestor substanțe asupra fracțiunilor celulare este complexă, implicînd direct sau indirect, prin fenomenele redox, modificări ale permeabilității, ale transportului ionilor. Hidroxilarea steroizilor are loc în mitocondriile și microzomii suprarenalei. Există multe analogii între hidroxilarea mitocondrială a steroizilor și hidroxilarea microzomială, iar tulburările acestor procese (în special de ordin genetic) duc la instalarea fenomenelor de insuficiență suprarenală, cu răsfrîngeri în metabolismul hidromineral, tulburări vasculare sau chiar manifestări grave ale bolii lui Addison [33].

Un capitol în care deocamdată cercetările sînt la început este acela al relației dintre hormoni și diferitele fracțiuni subcelulare. Astfel se manifestă tendința de a explica acțiunea hormonilor prin influența lor asupra sintezei de *m*ARN specific în organul receptor [22]. Estradiolul, testosterona, insulina sînt stimulatori ai acestei sinteze. Tendințele amintite ne pot oferi posibilitatea elucidării modului de acțiune al hormonilor la nivel molecular al reglării sintezei și degradării lor.

INHIBITORII METABOLISMULUI MEDICAMENTELOR

Se cunosc o serie de compuși cu efecte inhibitorii asupra enzimelor microzomiale, cum ar fi iproniazida, cloramfenicolul — care prelungește acțiunea hexobarbitalului —, metilendioxifenilul — care se întrebuințează pentru a crește toxicitatea diferitelor insecticide prin inhibarea metabolismului insectelor — etc.

Un timp s-a crezut că enzimele sistemului microzomial sînt inhibate necompetitiv de β-dietil-aminoetil-difenil-propil-acetat (SKF 525 A), care nu exercită o acțiune farmacodinamică prin sine însuși, ci prelungește efectul unor compuși (barbiturice, amfetamină). Totuși, acțiunea SKF 525 A nu poate fi extinsă asupra tuturor sistemelor enzimatice implicate în metabolizarea medicamentelor. De exemplu inhibă N-dealchilarea monometil-*4*-amino-antipirinei, dar nu și a monoetil-*4*-amino-antipirinei, inhibă N- și O-demetilazele, dar nu și S-demetilazele [29].

TOXICITATEA SUBSTANȚELOR MEDICAMENTOASE

Din punct de vedere biochimic, acțiunea toxică a substanțelor medicamentoase care pătrund în celulă poate fi explicată în mai multe moduri:

a) Inhibarea reacțiilor primordiale ale formării unor enzime celulare prin acțiunea asupra sistemelor de informație genetică sau retroinhibiția lanțului metabolic sau în mod fizicochimic (competiția de substrat etc.).

b) Toxicul poate fi reprezentat nu de substanța însăși, ci de un metabolit care ia naștere în celulă. Am văzut acest lucru cînd am discutat despre fenomenul de toxifiere care are loc prin metabolizarea unor droguri.

c) Dacă nici substanţa ca atare, nici metaboliţii săi nu sînt toxici, fiind vorba de o transformare rapidă şi de o eliminare adecvată, se poate ca însuşi procesul de metabolizare să necesite deturnarea unei căi metabolice, prin aceasta ducînd la acumulări sau consumări anormale de metaboliţi şi de cofactori. Aceasta poate duce, în timp, la transformări în sistemul celular şi la formarea unor structuri incompatibile cu funcţionarea armonioasă a celulei. Consecinţa va fi steatoza, degenerescenţa protoplasmatică şi nucleară sau chiar necroza celulelor. În fenomenul de necroză se produc scăderi ale esterilor fosforici ai ozelor, ATP-ului, tulburări electrolitice privitoare în special la raportul Na^+/K^+, distrugerea fosfolipidelor şi a acizilor nucleici. Nu putem intra în amănunte asupra punctelor enumerate mai sus dar, considerînd îndeosebi celula hepatică ca sediu al manifestării leziunilor medicamentoase, acest organ ne va interesa în mod deosebit. Se poate ajunge là o toxicitate adevărată, reproductibilă experimental, cu reacţie între doză şi efect, într-un interval scurt şi constant între administrare şi leziune, totdeauna cu aceleaşi aspecte histologice.

În afară de aceste tulburări, se menţionează idiosincraziile medicamentoase, care reprezintă susceptibilităţi individuale explicate prin anomalii de metabolizare care pot duce la o acumulare anormală a medicamentului în sînge, favorizînd toxicitatea hepatică şi extrahepatică. Idiosincrazia este caracterizată printr-o frecvenţă mică, imprevizibilitate, nereproductibilitate experimentală, cu apariţia unor simptome la un timp oarecare după administrare. Readministrarea medicamentului în aceste cazuri aduce recidivări clinice şi biologice dar uneori, în mod surprinzător, constatăm şi o desensibilizare a organismului.

Sînt de reţinut considerentele imunologice asupra medicamentelor, cu apariţia de anticorpi cu acţiune asupra ficatului, microscopia arătînd că aceste substanţe se leagă mai mult de nucleii hepatocitelor decît de citoplasmă. Clinic, se înregistrează hepatite medicamentoase de două tipuri : *a*) tipul citolitic, în mod clasic produs de iproniazidă, şi *b*) tipul colostatic, provocat de largactil şi, în general, de derivaţi de fenotiazină. Tipul citolitic are asemănări cu hepatitele virotice, fiind însă mai benign. Microscopul electronic a pus în evidenţă în hepatitele citolitice alterări mitocondriale şi microzomiale. Un studiu amplu din acest punct de vedere a fost întreprins de Berthelot şi colaboratori.

Hepatitele colostatice au evidenţiat la microscopul electronic dilatarea canaliculelor biliare, rărirea sau chiar dispariţia microvilozităţilor, o regrupare a mitocondriilor şi microzomilor la nivelul celulelor centro- sau mediolobulare şi, uneori, alterarea evidentă a mitocondriilor. Nu se poate face o distincţie absolută între focarele citolitice şi cele colostatice ca leziuni hepatice medicamentoase, deoarece s-au pus în evidenţă şi forme mixte.

Prezentată la redacţie la 28 decembrie 1965

Catedra de chimie biologică a Institutului medico-farmaceutic, Cluj

BIBLIOGRAFIE

1. Al-Kassab, S., Boyland, E., Williams, K., Biochem. J., **87**, 4 (1963).
2. Axelrod, J., Inscoe, J. R., Tomkins. G. M., J. biol. Chem., **232**, 835 (1958).
3. Bacq, Z. M., *Pharmacodynamie biochimique*, Masson, Paris, 1961.
4. Black, S., Ann. Rev. Biochem., **33**, 398 (1964).
5. Bridges, J. W., Williams, R. T., Biochem. J., **83**, 27 P (1963).
6. Brodie, B. B., Erdös, E. G., *Proc. First Intern. Pharmacol. Meeting.* 6 : *Metabolic Factors Controlling Duration of Drug Action*, Pergamon Press, Londra, 1962.
7. Brodie, B. B., Gillette, J. R., La Du, B. N., Ann. Rev. Biochem., **27**, 427 (1958).
8. Butler, T. C., Federation Proc., **17**, 1158 (1958).
9. Boyland, E., Manson, D., Nerry, R., Biochem. J., **86**, 263 (1963).

10. Calvin, H. L., Vande Wiele, R. L., Lieberman, S., Biochemistry, **2**, 448 (1963).
11. Cooper, D. I., Estabrook, R. W., Rosenthal, O., Federation Proc., **23**, 223 (1964).
12. Conney, A. H., Gilman, A. G., J. biol. Chem., **238**, 3682 (1963).
13. Creaven, P. J., Parke, D. W., Williams, R. T., Biochem. J., **91**, 12 P (1964).
14. Cucinell, S. A., Koster, R., Conney, A. H., Burns, J. J., J. Pharmacol. Exp. Therap., **141**, 157 (1963).
15. Davis, B. D., Arch. Biochem. Biophys., **78**, 497 (1958).
16. Estabrook, R. W., Cooper, D. W., Rosenthal, O., Biochem. Z., **338**, 741 (1963).
17. Fouts, J. R., Biochem. Biophys. Res. Comm., **6**, 373 (1961).
18. Imai, Y., Sato, R., Biochim. Biophys. Acta, **42**, 164 (1960).
19. Kato, R., Chiesara, E., Vassarelli, P., Biochem. Pharmacol., **12**, 591 (1963).
20. Krisch, K., Biochem. Z., **337**, 546 (1963).
21. Krisch, K., Staudinger, Hj., Biochem. Z., **334**, 312 (1961).
22. Kruh, J., Rev. Franç. Etudes Clin. Biol., **10**, 271 (1965).
23. Mason, H. S., Ann. Review Biochem., **34**, 595 (1965).
24. Mitoma, C., Posner, H. S., Reitz, H. C., Udenfriend, S., Arch. Biochem. Biophys., **61**, 431 (1956).
25. Narasimhulu, S., Rosenthal, O., *Sixth Intern. Congress of Biochemistry*, 10—16 august 1964, Abstracts, IV—119.
26. Nilsson, A., Johnson, B. C., Arch. Biochem. Biophys., **101**, 494 (1963).
27. Quick, A. J., Ann. Rev. Biochem., **6**, 291 (1937).
28. Scheline, R. R., Williams, R. T., Wit, J. G., Nature, **188**, 849 (1960).
29. Schuster, L., Ann. Rev. Biochem., **33**, 571 (1964).
30. Siekevitz, P., Ann. Rev. Pharmacol., **25**, 15 (1963).
31. Smith, A. A., Biochim. Biophys. Acta, **69**, 203 (1963).
32. Smith, M. E., J. Pharmacol. exp. Therap., **134**, 233 (1961).
33. Talalay, P., Ann. Rev. Biochem., **34**, 347 (1965).
34. Remy, C. N., J. biol. Chem., **238**, 1078 (1963).
35. Waddell, W. J., Smith, J. A. , Butler, T. C., Pharmacologist, **5**, 240 (1963).
36. Williams, R. T., *Detoxication Mechanism*, Edit. Willey, New York, (1959).

ST. CERC. BIOCHIM., 9, 2, 207 – 224 (1966)

GLICOLIZA ŞI REGLAREA SA ENZIMATICĂ ÎN CURSUL CONTRACŢIEI MUSCULARE

DINU TĂNĂSESCU

612.816

În condiţii anaerobe, glicogenul, una dintre principalele substanţe de rezervă ale organismului, se degradează printr-o succesiune de reacţii catalizate de 12 enzime. În cursul acestui proces, denumit glicoliză, care începe cu scindarea din molecula glicogenului a unui rest de glucoză ce se metabolizează pînă la acid lactic, se formează 4 moli de ATP, reacţia fiind exergonică.

Deşi secvenţa generală, globală, este de multă vreme cunoscută, totuşi cercetările recente, beneficiind de aportul tehnicii moderne — care devine din ce în ce mai fină şi mai adecvată scopului urmărit —, au demonstrat că intimităţile acestui proces sînt încă departe de a fi total dezvăluite. Au fost astfel descoperite în ultimul timp detalii care măresc complexitatea acestor succesiuni de reacţii enzimatice.

Interesul pe care-l stîrneşte acest proces este pe deplin justificat, deoarece cunoaşterea sa nu constituie doar o simplă necesitate a unei cercetări care se încheie cu rezolvarea problemei, ci este legată de cunoaşterea unuia dintre procesele vitale ale organismului, metabolismul glucidic, prin a cărui cunoaştere temeinică se vor putea controla în viitor multe reacţii de o foarte mare importanţă din domeniul biochimiei, medicinii, fiziologiei, bacteriologiei, industriei alimentare etc.

Deşi glicoliza nu constituie un proces principal de producere a energiei, totuşi, fiind ciclul de reacţii prin care organismul îşi realizează energia de imediată instanţă, care acoperă necesarul energetic din primele etape, importanţa sa reiese în mod evident.

Pînă nu de mult, glicoliza a fost urmărită în special prin variaţiile cantitative ale termenilor săi finali, acidul piruvic şi acidul lactic; cu alte cuvinte, studiul s-a făcut global, prin cunoaşterea sumei activităţilor enzimatice ale tuturor celor 12 enzime angajate. Evident, în aceste condiţii, multe dintre detalii au scăpat cercetării. În ultima decadă, studiul glicolizei a fost atacat mai complex, iar în ceea ce priveşte unele procese de care ne vom ocupa de asemenea în articolul de faţă, ele au fost semnalate abia în ultimii doi ani. Aceste procese, recent puse în evidenţă, au demonstrat rolul de reglare jucat de cîteva enzime glicolitice, şi anume fosforilazele *a* şi *b*, fosfofructokinaza şi aldolaza. Catalizînd reacţii-cheie, aceste enzime pot contribui, în anumite instanţe, atît la frînarea şi limitarea reacţiilor, cît şi la declanşarea, accelerarea şi menţinerea la un nivel ridicat al întregii succesiuni de reacţii.

Aceste încetiniri şi accelerări ale reacţiilor enzimatice au loc extrem de rapid şi din această cauză nu au putut fi semnalate decît după ce au fost elaborate tehnici de îngheţare

extrem de rapide, pentru a surprinde enzima în faza de activitate din momentul dat, ca şi metode fine de extracţie şi de dozare a activităţii enzimatice. Deşi noile tehnici mai au încă o serie de lacune, totuşi au constituit şi constituie metode adecvate scopului urmărit.

Organul pe care au fost şi continuă să fie urmărite procesele pe care le vom descrie, este, în marea majoritate a cazurilor, muşchiul scheletic. Aceasta se datoreşte faptului că muşchii se pretează cel mai bine scopului urmărit, din mai multe motive, şi anume : *a*) muşchiul conţine întreg echipamentul enzimatic al reacţiilor glicolitice ; *b*) muşchiul izolat îşi păstrează activitatea sa fiziologică şi biochimică într-un grad foarte apropiat de acela al muşchilor *in vivo*, ceea ce permite o extrapolare a rezultatelor obţinute pe muşchiul izolat la muşchii din animalul viu ; *c*) muşchiul, datorită caracteristicilor sale funcţionale, poate fi supus — cu ajutorul stimulilor electrici — unui efort, ceea ce face să se declanşeze, simultan cu prima contracţie, o activitate crescută a glicolizei ; *d*) activitatea glicolitică poate fi urmărită şi corelată cu intensităţile controlate ale stimulilor electrici la care este supus muşchiul ; *e*) rezultatele obţinute cu muşchiul izolat stimulat electric, pot fi comparate cu cele din muşchiul pereche nestimulat, ceea ce permite raportarea datelor obţinute faţă de activitatea fiziologic normală a muşchiului în repaus ; *f*) muşchiul izolat păstrîndu-şi activităţile fiziologice şi biochimice la un nivel apropiat de acela din animal, se pot urmări şi extrapola efectele inhibitorilor enzimatici şi ale altor substanţe farmacologice, ca şi exosmoza ionilor şi a diverse alte componente din muşchii trataţi sau stimulaţi. De asemenea, metabolismul muscular poate să mai fie urmărit *in vivo* prin perfuzare cu diverse soluţii în care pot fi introduşi inhibitori enzimatici, substanţe cu activitate farmacologică etc. Prin toate aceste variante se permite atît studiul în etape al secvenţei de reacţii enzimatice, aprofundarea proceselor induse de diverse substanţe, cît şi variaţiile nivelului substratelor respective.

Toate aceste considerente au făcut ca muşchiul scheletic, şi în special cel de broască, să fie astfel subiectul numeroaselor studii efectuate asupra acestor procese de reglare a glicolizei

SCURTĂ PRIVIRE GENERALĂ ASUPRA GLICOLIZEI

Cunoaşterea etapelor acestui proces se datoreşte studiilor efectuate de pionierii biochimiei, care, în condiţiile tehnice limitate de acum 30—40 de ani, au reuşit să determine atît structura esterilor fosforici, cît şi calea lor de transformare pînă la termenii finali. Prin cercetările întreprinse pentru precizarea acestor succesiuni de transformări şi-au imortalizat numele Meyerhof, Lohmann, Harden, Yung, Cori, Embden, autori care au pus bazele biochimiei ca ştiinţă de sine stătătoare. Cunoaşterea glicolizei, denumire care a fost acordată de aceşti cercetători, a constituit prima şi o fundamentală cucerire a unui vast proces biochimic.

Deşi secvenţa este cunoscută, totuşi glicoliza continuă să stea, datorită rolului său determinant, în centrul unui complex efort colectiv de cunoaştere a detaliilor sale. În cursul acestui articol vom urmări cîteva dintre aceste probleme moderne, dezvăluite de biochimia anilor noştri.

Pentru o mai uşoară înţelegere a lor, vom trece pe scurt în revistă, amintind aspecte noi, întregul ansamblu de procese ale glicolizei.

Procesul, în mare, constă din degradarea glicogenului, mai exact a unui rest de glucoză esterificată cu acid fosforic pînă la acidul piruvic. Întreg ansamblul de degradare constă din 12 etape distincte, succesive, catalizate sub acţiunea a tot atîtea enzime glicolitice. Aceste etape, ca şi enzimele care le catalizează, pot fi urmărite în schema din figura 1.

Pentru a se înţelege mai bine acest proces este însă necesar înainte de toate să specificăm locul său de desfăşurare, ca şi localizarea, în fibra musculară, a enzimelor participante. Privind o fotografie, efectuată la microscopul electronic, a unei secţiuni printr-o fibră musculară,

se constată că ea este formată dintr-o serie de zone clare și obscure care constituie miofibrilele. Miofibrilele, la rîndul lor, sînt formate din miofilamente mai groase, constituite din miozină, și subțiri, din actină. Miozina și actina constituie proteinele contractile ale mușchilor. Între miofibrile există o serie de spații în care pot fi observate atît un sistem de canale extrem de fine — reticulul sarcoplasmatic —, cît și mitocondrii. De asemenea, în tot acest spațiu se mai găsește o soluție în care sînt solubilizate proteine, denumite proteine sarcoplasmatice, ioni și diverse alte substanțe. În acest lichid se găsesc solubilizate toate enzimele glicolitice, cu alte cuvinte locul de desfășurare a glicolizei se găsește în aceste spații interfibrilare (fig. 2).

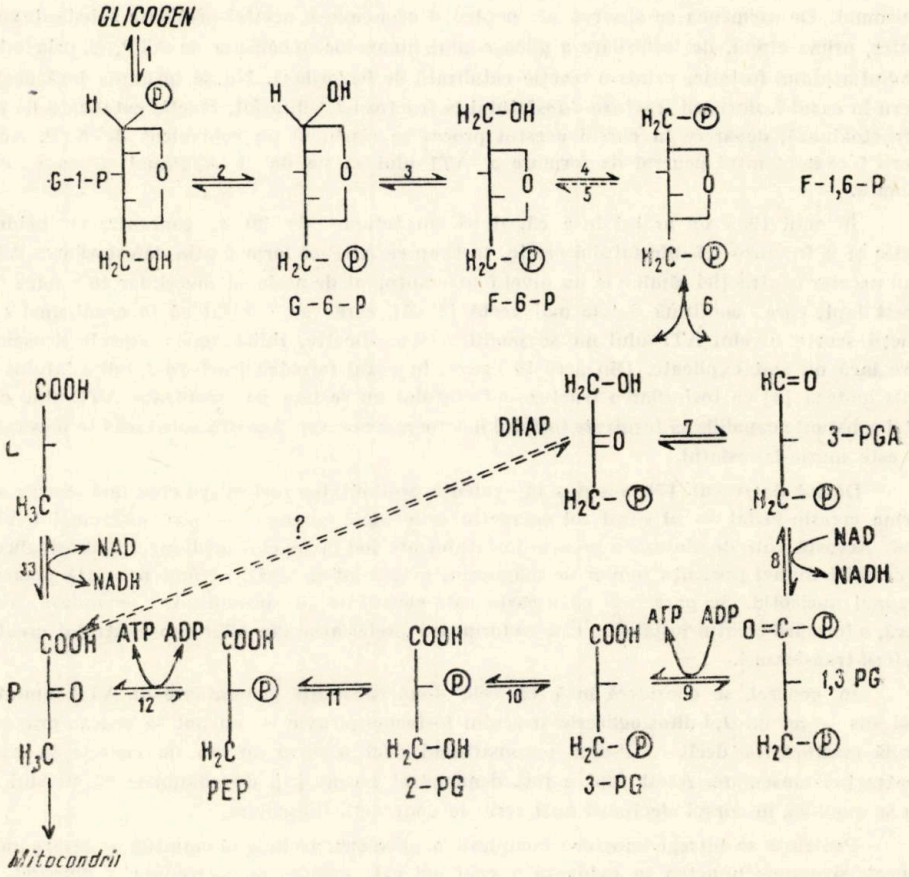


Fig. 1. — *Glicoliza, cu etapele și enzimele care le catalizează.*

G-1-P = glucozo-*1*-fosfat; *G-6-P* = glucozo-*6*-fosfat; *F-6-P* = fructozo-*6*-fosfat; *F-1,6-P* = fructozo-*1,6*-difosfat; *DHAP* = dihidroxiaceton-fosfat; *3-PGA* = *3*-fosfogliceraldehid; *1,3-PG* = acidul *1,3*-difosfogliceric; *3-PG* = acidul *3*-fosfogliceric; *2-PG* = acidul *2*-fosfogliceric; *PEP* = acidul fosfoenolpiruvic; *P* = acidul piruvic; *L* = acidul lactic;

Etapele sînt catalizate de următoarele enzime: *1* — fosforilaza; *2* = fosfoglucomutază; *3* = fosfoglucoizomerază; *4* = fosfofructokinază; *5* = fructozo-*1,6*-difosfataza; *6* = aldolaza; *7* = triozofosfat-izomeraza; *8* = gliceraldehid-fosfat-dehidrogenaza; *9* = fosfogliceril-kinaza; *10* = gosfogliceril-mutaza; *11* = enolaza; *12* = piruvat-kinaza; *13* = lacticodehidrogenaza.

În cursul alunecării filamentelor de miozină şi de actină, care are loc în contracţia şi relaxarea muşchiului, se consumă ATP, scindat sub acţiunea ATP-azei miozinice şi care este refăcut prin glicoliză şi fosforilare oxidativă, ultimul proces desfăşurîndu-se în mitocondrii. În cursul acestor procese se resintetizează marea majoritate a ATP-ului consumat, existînd însă şi alte mecanisme de refacere, ca de exemplu din creatin-fosfat, reacţie catalizată de creatin-fosforil-transferază, sau din ADP, sub controlul miokinazei.

Urmărind schema, se poate constata că în cursul glicolizei se disting două etape generatoare de ATP, care au loc la nivelul acidului *1,3*-difosfogliceric şi la acela al acidului fosfoenol-piruvic. Există o strînsă relaţie — cunoscută de mult [1], [2] — între cantitatea de acid lactic format în cursul procesului de contracţie musculară şi resinteza ATP-ului consumat. De asemenea se observă că, pentru o economie a acestei preţioase substanţe energetice, prima etapă, de fosforilare a glicogenului, nu are loc cu consum de ATP, ci prin intermediul acidului fosforic, printr-o reacţie catalizată de fosforilază. Nu se întîmplă însă acelaşi lucru în cazul fosforilării fructozo-*6*-fosfatului la fructozo-*1,6*-difosfat, reacţie catalizată de fosfofructokinază, deoarece în cursul acestui proces se consumă un echivalent de ATP. Acest lucru face ca bilanţul general de formare a ATP-ului să fie de 3 ATP/mol glucoză consumată.

În anul 1965 s-a arătat însă că, după un tetanos de 30 s, concentraţia acidului lactic şi a fructozo-*1,6*-difosfatului creşte, în timp ce ADP-ul format prin defosforilarea ATP-ului necesar contracţiei rămîne la un nivel foarte apropiat de acela al muşchilor în repaus [3]. Acest fapt, care confirmă datele mai vechi [4—6], care au arătat că în cazul unei contracţii scurte nivelul ATP-ului nu se modifică semnificativ, ridică unele aspecte deosebite, care încă nu sînt explicate. Din această cauză, în cazul formării fructozo-*1,6*-difosfatului s-a emis ipoteza [3] că fosforilarea fructozo-*6*-fosfatului nu se face pe socoteala ATP-ului ci a altei substanţe capabile să furnizeze fosfatul macroergic necesar. Această substanţă se presupune că este inozin-trifosfatul.

Destul de recent [7], s-a pus în evidenţă posibilitatea fosforilării creatinei pentru a se forma creatin-fosfat — al cărui rol energetic este bine cunoscut — fără intermediul ATP-ului. Această cale de sinteză a creatin-fosfatului are loc la nivelul acidului *1,3*-difosfogliceric şi necesită numai prezenţa ionilor de magneziu, ortofosfat şi NAD, nefiind necesară prezenţa vreunui nucleotid. Se pare însă că această cale constituie o posibilitate secundară, auxiliară, a formării creatin-fosfatului, care se formează preferenţial din ATP sub controlul creatin-fosforil-transferazei.

În general, se consideră însă că cele două substanţe generatoare de ATP amintite mai sus — acidul *1,3*-difosfogliceric şi acidul fosfoenol-piruvic — nu pot să cedeze gruparea labilă macroergică decît ADP-ului, neconstituind deci o sursă directă de energie în cazul contracţiei musculare. Acest fapt a fost demonstrat recent [8], dovedindu-se că nivelul lor nu se modifică în cursul efectuării unei serii de contracţii musculare.

Pentru a se întregi imaginea complexă a glicolizei, trebuie să amintim şi despre un alt aspect, şi anume punerea în evidenţă a unei noi căi, ocolite, de degradare a glucozei. Se ştie că NADH sarcoplasmatic, care se formează în cursul reacţiei catalizate de gliceraldehid-fosfat-dehidrogenaza (vezi fig. 1), nu poate să părăsească locul său de formare datorită existenţei membranelor mitocondriale [9—11], ceea ce face ca să nu poată fi oxidat de mitocondrii, ci numai de enzimele din sarcoplasmă. Calea sa principală de oxidare are loc la nivelul acidului piruvic, care se transformă în acid lactic. Totuşi, recent s-a observat că poate să existe o variantă de oxidare, şi anume conform reacţiei [12], [13].

$$NADH + H^+ + \text{dihidroxiaceton-fosfat} \rightleftharpoons NAD + \alpha\text{-glicerofosfat.}$$

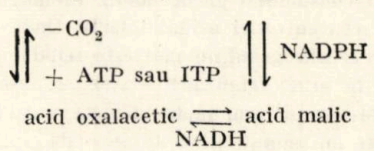
Fig. 2. — Microfotografia electronică a unei secţiuni longitudinale dintr-un muşchi scheletic de şoarece. Se disting zonele clare şi obscure (*I*, *A*, *M*, *A*, *I*) ale unui sarcomer (intervalul dintre două membrane *Z*). În dreptul membranei *Z*, în spaţiile interfibrilare se observă reticulul sarcoplasmatic şi mitocondrii (*Mi*). Mărire de aproximativ 68 000 ×.

(Reproducere după A. MARGRETH, U. MUSCATELLO, E. ANDERSSON-CEDERGREN, Exp. Cell. Res., **32**, 484, 1963, cu aprobarea autorilor).

Prin această variantă de degradare se ocolește formarea acidului lactic, ajungîndu-se direct, după obținerea sub acțiunea aldolazei a celor doi triozofosfați, la acidul piruvic și la α-glicerofosfat, care constituie termenii finali ai acestei variante (fig. 1).

α-Glicerofosfatul poate ulterior să difuzeze în mitocondrii, unde este catabolizat, sau să participe în alte procese care au loc în sarcoplasmă. Reacția, care inițial a fost pusă în evidență în mușchii insectelor zburătoare, s-a constatat că are loc, într-o proporție mai redusă, și în mușchii mamiferelor, și se pare că are un rol important în special în timpul unui efort moderat [14].

În încheierea acestei scurte prezentări a procesului glicolitic, să urmărim resinteza glicogenului. Se știe că mușchiul are o capacitate redusă de a resintetiza glicogenul pornind de la acid lactic, posibilitate realizată într-un grad înaintat în ficat. Acest fapt se datorește activității reduse a două enzime, și anume a fructozo-*1,6*-difosfatazei, care catalizează formarea fructozo-*6*-fosfatului din fructozo-*1,6*-difosfat, și a piruvat-fosfokinazei, care poate resintetiza acidul fosfoenol-piruvic din acid piruvic. De altfel, această ultimă etapă are loc și în ficat, în special, pe o cale ocolită [15], [16]:



Recent [17], s-a arătat că și în mușchi există posibilitatea refacerii glicogenului consumat, evident într-o proporție mult inferioară celei din ficat, prin punerea în evidență a unei activități semnificative a fructozo-*1,6*-difosfatazei, al cărei singur rol este de a participa la glicogeneză. Această enzimă nu a putut fi pusă în evidență pînă acum, deoarece metodele de dozare în mușchi nu erau adecvate. S-au putut explica astfel datele mai vechi [18], [19] care indicau apariția glicogenului radioactiv în urma incubării omogenatelor de mușchi cu lactat și piruvat marcat.

Deoarece însă nici pînă astăzi nu s-a putut decela un sistem capabil să realizeze în mușchi o transformare a piruvatului în fosfoenol-piruvat, se presupune că reacțiile au loc printr-un alt mecanism, care nu este altul decît cel descris anterior, și anume prin intermediul α-glicerofosfatului, care se formează într-o cantitate apreciabilă în mușchii mamiferelor [20], [21].

O dată trecute aceste două bariere, glicogeneza poate decurge în mod firesc pe calea inversă degradării. Este de asemenea cunoscut faptul că enzimele care participă la sinteza glicogenului din glucozo-*1*-fosfat se găsesc în fracțiunea solubilă a mușchilor [22].

Existența membranelor mitocondriale face ca marea majoritate a substraturilor specifice celor două procese fundamentale ale metabolismului glucidic, glicoliza și respirația, să nu intre în contact direct, ceea ce delimitează strict locul de acțiune a celor două sisteme. Acest lucru nu înseamnă încă că cele două procese decurg independent unul de altul, ele intercondiționîndu-se. Influența lor reciprocă se manifestă prin furnizarea de „materii prime", și citățm ca exemplu acidul piruvic format în glicoliză, care difuzează în mitocondrii, iar produsul final al fosforilării oxidative, ATP-ul, este cedat sarcoplasmei.

Datorită caracteristicilor deosebite ale mediului de desfășurare — anaerob în glicoliză, aerob în respirație —, cele două procese se inhibă reciproc, fapt demonstrat de multă

vreme, şi reprezintă efectele Pasteur (inhibarea glicolizei de către respiraţie) şi Crabtree (inhibarea respiraţiei de către glicoliză).

După această scurtă trecere în revistă, esenţială pentru înţelegerea celor ce vor fi descrise ulterior, să vedem participarea glicolizei în procesul contracţiei musculare.

GLICOLIZA ÎN CURSUL CONTRACŢIEI MUSCULARE. GENERALITĂŢI

În cursul contracţiei musculare urmărită *in vitro*, prin stimularea electrică a muşchilor scheletici se produce o acumulare a acidului lactic, cu alte cuvinte se formează ATP, o creştere a nivelului hexozomonofosfaţilor şi o scădere a conţinutului în glicogen. În acest proces, suma hexozomonofosfaţilor + acid lactic ≅ glicogenul consumat [23—25], scindarea glicogenului fiind în funcţie de lucrul efectuat, deci de numărul de contracţii, de ritmul cu care se contractă muşchiul şi de starea sa de oboseală. Aceasta este imaginea generală a procesului pe care-l vom descrie.

În urma cercetărilor efectuate prin determinarea în muşchi a glicogenului şi a acidului lactic, s-a constatat că, prin stimularea electrică timp de cîteva secunde, acidul lactic creşte semnificativ, proporţional cu consumului glicogenului. Prelungind contracţia, o dată cu instaurarea oboselii, creşterea concentraţiei acidului lactic tinde spre un plafon maxim, care nu mai este depăşit, în timp ce glicogenul nu mai este scindat în acelaşi ritm iniţial ridicat. Acelaşi efect se constată şi în urma tetanizării muşchilor, însă procesele sînt mai greu de urmărit, oboseala instaurîndu-se mult mai rapid. Foarte scurt timp după încetarea stimulărilor — dacă nu se depăşeşte un anumit prag de oboseală — nivelul substratelor revine între limitele iniţiale. Cui se datoreşte această activare rapidă a glicolizei declanşate o dată cu primele contracţii, ca şi frînarea ei ca urmare a prelungirii duratei de stimulare? Declanşării unor reacţii enzimatice provocate de stimulii electrici. Acelaşi efect este provocat de altfel prin acţiunea unor substanţe cu puternic efect fiziologic, ca insulina, epinefrina etc.

În ultimul timp, cercetările îndreptate spre lămurirea acestor procese au demonstrat faptul că sistemul glicolitic, care acţionează ca un tot unitar, datorită strînsei interdependenţe dintre diferitele substraturi şi enzimele participante, conţine anumite „puncte-cheie" care pot activa sau încetini întregul proces. Din complicatul complex de interrelaţii care are loc vom insista în special asupra acţiunii enzimelor „cheie" mai temeinic studiate pînă acum, şi anume fosforilazele *a* şi *b* şi fosfofructokinaza.

Înainte însă de a intra în domeniul acestor interrelaţi stimulare — activare enzimatică — creşterea fluxului de degradare a substratelor, vom urmări observaţiile care au fost făcute pînă acum în ceea ce priveşte variaţia nivelului substratelor, adică al esterilor fosforici şi al acizilor lactic şi piruvic, care are loc în cursul contracţiilor. De la început trebuie precizat că asamblarea rezultatelor ridică probleme destul de acute, deoarece, condiţiile experimentale diferind între limite destul de largi, este necesară o privire critică, selectivă atît a lucrărilor recente, cît şi a celor mai vechi. În acelaşi timp, trebuie să avem în vedere faptul că unele aspecte din acest domeniu de activitate sînt foarte recente şi deci nu există pînă la ora actuală o asamblare totală, generală, a rezultatelor obţinute.

VARIAŢIA SUBSTRATURILOR ÎN CURSUL CONTRACŢIEI MUSCULARE

Acidul lactic. Determinarea acidului lactic intracelular şi a celui care difuzează din muşchi în mediul exterior a arătat că în muşchii în repaus există un nivel bazal, redus, dar suficient pentru a asigura necesarul energetic. Formarea acidului lactic în aceste condiţii

fiziologice este constantă și liniară în timp [26]. Acidul lactic format, fiind într-o cantitate limitată, nu se produce o acumulare intracelulară și este în același timp proporțional cu efluxul său.

Prin stimularea mușchilor, începînd de la trei contracții pe minut, crește concentrația acidului lactic atît intracelular, cît și a celui extracelular, creștere care este riguros liniară cu numărul de contracții efectuate. O dată cu creșterea numărului de contracții, efluxul lactatului este însă mai mic decît formarea sa, ceea ce atrage după sine o acumulare a lactatului intracelular.

În cazul stimulărilor cu o frecvență scurtă (3—35 de contracții pe minut), se observă inițial o scurtă perioadă de lag, fapt notat pentru prima oară de Meyerhof [27], care este inerentă, avînd în vedere sistemul multienzimatic participant. Se constată apoi un maxim de formare a lactatului intra- și extracelular, care am spus că este în funcție de numărul de contracții executate de mușchi, iar ulterior se instaurează, în timp, o aplatizare a curbei de acumulare a lactatului. Stimulînd mai energic mușchiul prin efectuarea de contracții singulare cu un ritm de 2—10/s sau prin tetanizare, perioada de lag nu mai apare [28].

În cazul stimulării mușchilor cu 50 de contracții pe minut, lactatul format este de 130 de ori mai crescut decît nivelul de bază ; prin stimulări cu un ritm și mai rapid sau în tetanos au fost obținute valori mult mai crescute, ceea ce arată capacitatea ridicată de activitate a sistemului glicolitic, care poate face astfel față unor eforturi intense, dar de o durată limitată.

Aplatizarea în timp a curbei de formare a lactatului se datorește, pe de o parte, efectului inhibitor al concentrației crescute a acidului lactic și a celorlalte substraturi și, pe de altă parte, unei reacții de apărare a organismului, manifestată la nivel enzimatic, pentru a se împiedica consumarea totală a rezervelor de glicogen. Din acest motiv, cu cît efortul este mai intens, cu atît inhibarea glicolizei începe mai rapid.

În afara determinărilor de lactat intra- și extracelular citate, o serie de alte cercetări au urmărit glicoliza în omogenate de mușchi incubate într-un mediu complex (Mg^{+2}, NAD, ATP, nicotinamidă etc.) în care au fost introduse diverse substraturi, ca : glicogen, glucozo-*6*-fosfat, fructozo-*6*-fosfat, fructozo-*1,6*-difosfat [29], [30]. În aceste condiții, s-a constatat în primul rînd că glicoliza este mai redusă în fracțiunea obținută prin ultracentrifugare la 100 000 *g* (reticul sarcoplasmatic, microzomi etc.) față de omogenatul total. Acest lucru dovedește că proteinele sarcoplasmatice sînt cele responsabile de activitatea majoră glicolitică, nu proteinele din celelalte formațiuni. De asemenea, s-a constatat că în omogenatele mușchilor stimulați timp de 1, 3 și 5 min rata glicolizei este în funcție de substratul adăugat și de durata stimulării. Cercetările efectuate au dezvăluit aspecte noi, dintre care unele implică procese care încă nu pot fi explicate. Cercetările ulterioare vor lămuri, desigur, aceste date.

Deci în cazul stimulării mușchilor se constată, în funcție de numărul și de ritmul contracțiilor efectuate, că acumularea acidului lactic începe o dată cu primele contracții efectuate și poate atinge valori foarte ridicate. Acest fapt oglindește o creștere a întregii activități glicolitice, care este mult mai mare decît aceea a mușchilor în repaus. Atît creșterea concentrației acidului lactic, cît și scăderea glicogenului nu decurg liniar, existînd tendința de inhibare a glicolizei prin instaurarea oboselii.

În timp ce formarea acidului lactic în cursul contracției musculare a fost mult studiată în diverse variante și condiții experimentale, nu putem spune același lucru în ceea ce privește variațiile cantitative ale celorlalte substraturi ale glicolizei. Acest fapt se datorește lipsei unor tehnici selective și cu mare sensibilitate, avîndu-se în vedere concentrația lor scăzută din mușchi și dificultățile care intervin în determinarea lor individuală. În ultimii ani au început totuși să apară lucrări și în această direcție, fiind însă departe de a epuiza și a lămuri aspectele complexe ale acestei probleme.

Acidul piruvic. Cu tot rolul său fundamental în metabolismul glucidic, acidul piruvic nu a fost încă suficient urmărit. Deşi constituie ultimul termen al glicolizei, concentraţia sa în ţesutul muscular este mult mai mică decît aceea a acidului lactic, datorită faptului că echilibrul reglat de lactic-dehidrogenază este îndreptat spre formarea acidului lactic [31]. Organismul realizează astfel, prin transformarea acidului piruvic în acid lactic, formarea unui depozit din care se „pompează" un debit constant, reglat, de acid piruvic spre mitocondrii. Se evită în acest fel un export de acid piruvic, plin de fluctuaţii, spre mitocondrii, care ar depăşi — în anumite cazuri — posibilităţile sale de metabolizare şi astfel ar avea loc inerente pierderi.

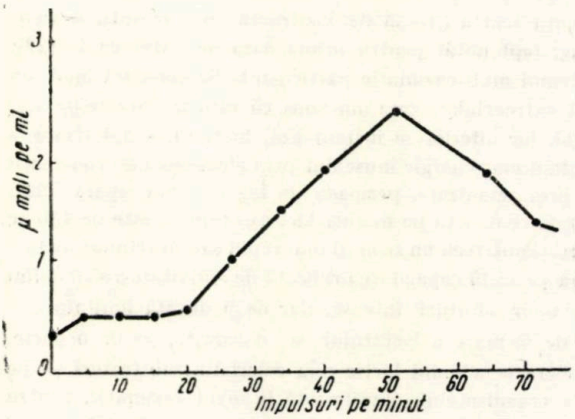


Fig. 3. — Curba de formare a glucozo-*6*-fosfatului în cursul stimulării muşchilor cu un număr variabil de impulsuri electrice.

În urma tetanizării muşchilor timp de 15 şi 30 s [32], valorile acidului piruvic cresc proporţional cu creşterea acidului lactic. În acelaşi timp, s-a constatat că raportul acid lactic/ acid piruvic rămîne practic neschimbat faţă de cel iniţial al muşchilor în repaus, deşi valorile absolute ale celor doi acizi cresc mult, ceea ce înseamnă că raportul NADH/NAD este de asemenea constant.

Glucozo-6-fosfatul (G — *6* — P). Urmărindu-se acumularea de G — *6* — P în cursul contracţiei musculare, s-a constatat că aceasta urmează în linii mari o curbă asemănătoare cu aceea a lactatului, acumularea sa începînd de asemenea după primele secunde de stimulare. Cu toate acestea, se disting unele diferenţe marcate în ceea ce priveşte variaţiile celor două componente. Astfel, perioada de lag este mai lungă, aplatizarea curbei se instaurează mai rapid în urma oboselii muşchilor şi, ceea ce este mai distinctiv, acumularea sa nu este proporţională cu numărul de contracţii efectuat de muşchi, ca în cazul lactatului [26]. După cum se vede din figura 3, acumularea G-*6*-P are un maxim la 50 de contracţii pe minut, pentru ca după aceea să scadă.

Aceste ultime constatări, care pun în evidenţă o lipsă de ritmicitate în ceea ce priveşte acumularea G-*6*-P, implică procese care încă nu sînt explicate. Pentru a exemplifica aceste observaţii, notăm că la 18 contracţii pe minut, în timp ce nivelul lactatului este crescut de aproximativ 30 de ori, G-*6*-P nu creşte semnificativ. Prin creşterea numărului de contracţii, la peste 50/min, deci după depăşirea numărului de contracţii care produce un maxim de acumulare, nivelul G-*6*-P începe să scadă, probabil datorită unei activări a fosfofructokinazei, deoarece pînă acum nu s-a constatat că glucozofosfat-izomeraza, enzima care catalizează transformarea G-*6*-P în F-*6*-P, ar avea un rol de reglare [33].

Fructozo-1,6-difosfat (F-*1,6*-P). Variaţia nivelului F-*1,6*-P în cursul contracţiei musculare nu a fost studiată încă în amănunţime. S-a constatat totuşi că, prin tetanizarea muşchilor timp de 10 secunde, se produce o acumulare a F-*1,6*-P care este mai evidentă în cazul muşchilor ce au fost încărcaţi prin ataşarea unei greutăţi de 5 g [33].

Este interesant de notat că această constatare nu mai este regăsită în cazul G-*6*-P şi al F-*6*-P. Nu s-a dat încă nici o explicaţie asupra acestei observaţii, deşi se ştie de mult că acidul lactic creşte mult mai evident în muşchii încărcaţi [35].

Triozofosfații. Comportarea acestor compuși încă nu a fost cercetată sistematic; studii cu totul izolate au demonstrat totuși că și concentrația lor crește după o tetanizare cu o durată de o secundă [36].

Glicogenul. Degradarea sa a fost urmărită în paralel cu creșterea concentrației de acid lactic și s-a constatat că există o strînsă dependență între aceste două substanțe [37].

Ortofosfatul. Deși ortofosfatul nu poate fi considerat ca substrat al glicolizei, totuși, datorită participării sale în diverse etape ale glicolizei și datorită faptului că în efort compușii fosforici au un rol deosebit, amintim cîteva observații referitoare la variațiile sale în cursul contracției musculare.

Variațiile ortofosfatului prezintă o perioadă de lag lungă, similară G-6-P, prezentînd o creștere a concentrației sale însă numai după stimulări cu cel puțin 20 de contracții pe minut [26], [38—40]. Ca și în cazul lactatului, ortofosfatul exosmozează prin mușchi în mediul înconjurător, proporțional cu efortul depus de mușchi.

Ca o concluzie a acestui capitol reiese că toate substraturile citate prezintă variații ale concentrațiilor lor care sînt dependente de numărul de contracții efectuate. Este însă de remarcat faptul că nu se poate trage nici o regulă generală de comportare. Lipsa unei creșteri unitare, egale, a tuturor substraturilor față de un număr dat de contracții efectuate de mușchi ne face să considerăm că întreg procesul nu decurge într-un flux egal, continuu de degradare. Existența acelor puncte-„cheie" enzimatice, de reglare, justifică lipsa acestui flux regulat, unitar. Dar aceste lucruri le vom dezvolta în paginile următoare.

REGLAREA ENZIMATICĂ A GLICOLIZEI

După cum am văzut pînă acum, sistemul glicolitic are un rol deosebit în refacerea compușilor macroergici consumați în cursul contracției musculare. Deși această interdependență a fost cunoscută de multe vreme, totuși de-abia în ultimii ani a fost clarificată, mai corect spus a început să se clarifice legătura dintre contracția musculară și modul de declanșare a reacțiilor chimice prin care este furnizată energia. Au fost deci necesare cercetări care să lămurească fără echivoc care sînt, cum se declanșează și cum decurg procesele glicolitice, mai ales datorită faptului că pînă de curînd activitatea contractilă a mușchilor și relațiile acestora cu reacțiile endergonice s-au bazat, în special, pe măsurători de căldură, baza chimică a reacțiilor fiind incomplet cercetată. Deci numai o demonstrare directă a succesiunilor proceselor chimice și a corespondenței lor cantitative față de energia eliberată poate lămuri natura legăturilor mecanochimice care au loc în mușchiul în contracție [42].

Înainte de a trece la descrierea proceselor enzimatice care decurg în mușchiul care se contractă, vom urmări caracteristicile fizico-chimice generale ale celor trei enzime cu rol de reglare cunoscute pînă acum: fosforilazele, fosfofructokinaza și aldolaza.

Fosforilazele. În 1936, C. F. Cori și G. T. Cori [43] au pus în evidență pentru prima oară o enzimă capabilă să catalizeze reacția:

$$\text{glicogen}_{n+x} + x \text{ fosfat anorganic} \rightleftharpoons x \text{ glucozo-1-fosfat} + \text{glicogen}_n$$

Ulterior, aceiași autori [44] au arătat că această enzimă se găsește în mușchi sub două forme, care au fost denumite fosforilaza *a* și fosforilaza *b*, ultima fiind activă numai în prezența 5′-AMP.

O dată cu obținerea sub formă cristalizată [45], [46], și cu perfecționarea metodelor de dozare [47], studiul lor a adus atît la precizarea structurii și a proprietăților fizico-chimice, cît și la participarea lor în diverse procese biochimice.

Astăzi se vorbește despre un sistem fosforilazic, deoarece s-a constatat că cele două fosforilaze sînt interconvertibile, trecînd cu ușurință dintr-o formă în alta, datorită acțiunii a două enzime diferite. Una catalizează reacția fosforilaza *b* → fosforilaza *a* și a fost denumită fosforilaza -*b*-kinaza [48], iar a doua, fosforilaza-fosfataza [49], participă în reacția inversă fosforilaza *a* → fosforilaza *b*.

Să trecem pe scurt în revistă descrierea acestor patru enzime.

Fosforilaza a este activă în absența 5′-AMP, are o greutate moleculară de 495 000 [49] și conține 8 moli de fosfat la 1 mol de proteină [50]. Patru dintre aceste grupări fosfat sînt acidolabile și pot fi separate de proteină ca piridoxal-5′-fosfat [50]. Restul grupărilor fosfor sînt acidostabile, legate ferm de serină [51], [52].

Fosforilaza b este activă numai în prezența 5′-AMP, are o greutate moleculară de 250 000 [49], conține 2 moli de piridoxal-5′-fosfat pe mol de enzimă și nu conține nici o grupare fosfat acidostabilă.

Fosforilaza-fosfataza este o fosfatază specifică, denumită formal și PR-enzima. Ea catalizează reacția:

Fosforilaza *a* → 2 fosforilaze *b* + 4 P_i

Enzima care este inhibată de florura de sodiu hidrolizează cele patru grupări fosfat acidostabile.

*Fosforilaza-***b***-kinaza* catalizează dimerizarea fosforilazei *b* în fosforilază *a* prin transferarea fosfatului macroergic al ATP unor resturi de serină din molecula enzimei. Reacția care are loc în prezența adenozin-3′, 5′-AMP ciclic ca activator [54—56] decurge în felul următor:

2 fosforilaze *b* + 4 ATP → fosforilaza *a* + 4 ADP

Enzima este inhibată de EDTA [47], [48].

În țesuturi, fosforilazele se găsesc într-o proporție de 90% sub formă *b*, care este considerată ca o formă inactivă sau cu activitate limitată. În cursul unei activități crescute a glicolizei, fosforilaza *a* crește brusc prin activarea fosforilazei-*b*-kinaza, putînd constitui, în anumite cazuri, chiar 95% din totalul fosforilazei.

Pentru înțelegerea materialului care urmează, vom aminti cîteva dintre proprietățile fizico-chimice ale celor două fosforilaze.

Grupările sulfhidril. Importanța acestor grupări reiese atît din faptul că cisteina este un activator, cît și din constatarea că fosforilaza *a* nu poate fi cristalizată decît în prezența ei. Prin titrare spectrofotometrică cu *para*-clor-mercuribenzoat s-a constatat că există 18 grupări —SH pe moleculă de enzimă [57], [58], care se pare că sînt toate sub formă redusă. Deși prin blocarea a două dintre aceste grupări activitatea enzimatică nu este influențată [59], restul grupărilor sînt absolut necesare activității.

Piridoxal-5′-fosfatul este considerat ca fiind gruparea prostetică a ambelor fosforilaze [52]. Este legat, sub forma unei structuri aldiminice substituite sau a unui derivat aminic secundar, de gruparea ε-aminică a lizinei din proteină. Se pare că prezența piridoxal-5′-fosfatului este necesară și pentru menținerea formei stabile a proteinei enzimatice, care este un tetramer.

5′-AMP este necesar activității catalitice a fosforilazei *b* și este strict specific, neputînd fi înlocuit cu nici un alt nucleotid. Este interesant de subliniat că și fosforilaza *a* este activată de 5′-AMP, dar la o concentrație de 2×10^{-6} M, care nu are nici un efect asupra activității fosforilazei *b*, care necesită pentru jumătate din activitatea maximă o concentrație de 5×10^{-5} M.

În ultimul timp [60] [61] au apărut lucrări care dovedesc că fosforilaza *b* este o proteină allosterică, ceea ce explică o serie de comportări față de diversele substraturi care o inhibă sau o activează.

Fosfofructokinaza. Încă din 1909 s-a observat că se produce o acumulare de fructozo-*1,6*-difosfat prin incubarea glucozei cu preparate de drojdie [62], iar din 1936 enzima a fost identificată și în mușchi [63].

Fosfofructokinaza a fost purificată într-un grad înaintat, ceea ce a permis studiul proprietăților sale fizico-chimice [64]. Cu toate acestea, această enzimă nu a fost încă studiată suficient, ținînd mai ales seama de importanța sa de enzimă participantă cu rol de reglare în procesele glicolitice.

Fosfofructokinaza catalizează transferul grupării fosfat terminale a ATP-ului la fructozo-*6*-fosfat, în prezența ionilor de magneziu. Specificitatea sa este mare deoarece nu catalizează nici o altă reacție de transfer. Nu s-a observat însă același lucru în ceea ce privește specificitatea față de substanța donatoare de grupări fosfat macroergice, deoarece în aceeași măsură ca și ATP-ul poate participa și ITP-ul și UTP-ul [65], [66].

Aldolaza a fost pusă în evidență în mușchi încă din 1934 de către Meyerhof și Lohmann [67]. Ea catalizează reacția :

D-fructozo-*1,6*-difosfat $\rightleftarrows$ dihidroxiaceton-fosfat + gliceraldehid-*3*-fosfat

Cristalizarea sa, care a fost realizată în 1948 [68], a permis studierea sa aprofundată din punct de vedere fizico-chimic.

Are o greutate moleculară de 150 000 [68], un pH optim de activitate între 7,5 și 10 [69]. Conține un număr ridicat de grupări —SH (28 sau 29 pe molecula de proteină, în funcție de tehnica utilizată) [70], [71], dintre care sînt esențiale activității minimum 16 grupări [70]. Din datele analizelor aminoacizilor terminali se consideră că aldolaza musculară este formată din trei lanțuri, fiecare cu o grupare N-terminală care provine de la un rest de prolină și una carboxilică care provine de la tirozină.

Specificitatea de acțiune a aldolazei poate fi schematizată în următoarele puncte [72] :

a) are un mare grad de selectivitate pentru dihidroxiaceton-fosfat ; grupările fosfat de la C_1, cetonică de la C_2 și hidroxilică de la C_3 sînt absolut necesare ;

b) configurația „trans" a carbonilor 3 și 4 este favorabilă, dacă nu absolut necesară ;

c) reacționează cu toate cele trei forme ale fructozei : piranozică, furanozică sau liniară, dar preferențial cu cea liniară.

Mecanismul de acțiune. Nu necesită prezența cationilor bivalenți [73]. Aldolaza formează un complex labil cu substratul cu care reacționează, care poate fi, în funcție de sensul reacției, dihidroxiaceton-fosfatul sau fructozo-*1,6*-difosfatul. Acest complex a putut fi pus în evidență datorită apariției unei benzi de absorbție la 235 și 240 mμ [74]. Pentru activitatea sa optimă sînt necesare atît grupările —SH, cît și cele tirozil [75].

PARTICIPAREA FOSFORILAZELOR **A** ȘI **B** LA PROCESUL CONTRACȚIEI MUSCULARE

Cel care a semnalat pentru prima oară variațiile nivelului fosforilazei *a* în cursul contracției musculare a fost Cori, în 1956 [24]. El a constatat o creștere semnificativă a fosforilazei *a* în mușchii tetanizați un timp foarte scurt, 10—15 s. Datorită însă dificultăților de tehnică, studiile nu au fost extinse decît o dată cu adaptarea — de către aceeași școală — a unei tehnici sensibile și mult mai perfecționate [76]. Această tehnică, prin introducerea în mediul de extracție a fluorurii de sodiu și EDTA-ului, care inhibă fosforilaza-fosfataza, respectiv fosforilaza-*b*-kinaza, permite, prin blocarea reacției de interconversiune fosforilaza *a* $\rightleftarrows$ fosforilaza *b*, determinarea nivelului real al celor două fosforilaze în țesuturi. În același timp, prin introducerea unei tehnici de înghețare extrem de rapide — cu azot lichid sau izopentan la —160°C și extragerea enzimei prin omogenizarea prafului de mușchi obținut

la —30°C, mediul de extracție conținînd 6% glicerină — s-a reușit să se surprindă enzima în faza sa reală de activitate din momentul dat.

Cu ajutorul acestei tehnici, utilizată cu mici variante de toți cei care urmăresc astăzi activitatea fosforilazelor, s-a putut constata că fosforilaza din mușchii în repaus este prezentă aproape în totalitate sub forma *b* (între 80 și 90%).

O dată cu primele secunde de contracție, raportul fosforilaza *b*/fosforilaza *a* se schimbă datorită unei creșteri rapide și marcate a procentului de fosforilază *a*. Astfel, după 3 s de la începerea unei serii de contracții tetanice fosforilaza *a* crește pînă la 60% din activitatea fosforilazică totală, cu o scădere proporțională a fosforilazei *b*. Această variație este dependentă însă de ritmul cu care se produc contracțiile și de durata de stimulare.

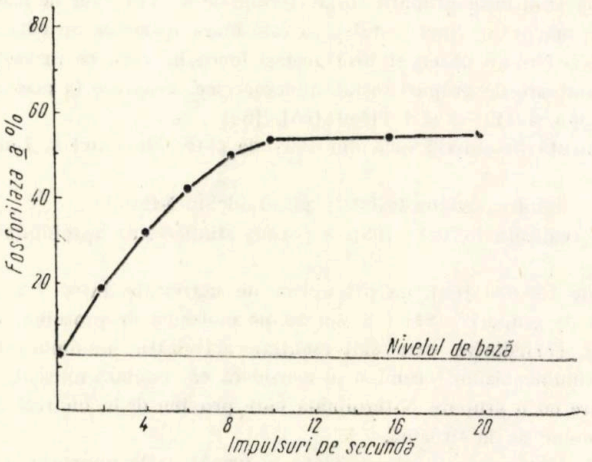


Fig. 4. — Variația procentului de fosforilază *a* în funcție de numărul de impulsuri pe secundă.

Prin stimularea cu 2 imp/s se constată inițial o perioadă de lag de aproximativ 25 de secunde înaintea unei creșteri semnificative a fosforilazei *a* [77]. Această peroadă de lag, notată și în cazul lactatului și al altor substraturi, se datorește unei anumite inerții inițiale în activarea fosforilazei-*b*-kinaza, deoarece se pare că activării acestei enzime și nu inhibării fosforilazo-fosfatazei se datorește creșterea nivelului fosforilazei *a*. Crescînd numărul de impulsuri la 6/s, perioada de lag nu se mai constată, creșterea fiind bruscă și începînd din primele secunde.

S-a constatat că formarea fosforilazei *a* este dependentă de numărul de impulsuri aplicate mușchilor, nivelul său crescînd pînă la 8 imp/s, după care se obține un platou constant (fig. 4).

Prin prelungirea duratei de stimulare la 1, 3 și 5 min, se constată că nivelul fosforilazei *a* începe să scadă, ajungînd după 1 min aproape de nivelul inițial, de bază; continuă să scadă după 3 min, iar după 5 min de stimulare valorile fosforilazei *a* sînt mult sub valorile de bază, aproape de zero. Acest fapt denotă o inhibiție a formării fosforilazei *a* datorită oboselii (fig. 5).

Este de notat faptul că, deși raportul fosforilaza *b*/fosforilaza *a* se modifică în cursul stimulării, totuși suma celor două fosforilaze, deci activitatea totală fosforilazică, nu prezintă modificări semnificative [76], [30].

Pentru a lămuri dacă răspunsul obținut prin aplicarea de stimulări între 2 și 8 imp/s este datorit contracției *per se* a mușchilor sau lucrului mecanic efectuat, s-a lucrat cu mușchi încărcați prin atașarea unor greutăți diferite [77]. S-a constatat însă că nu există nici o diferență în ceea ce privește variația fosforilazei *a* între mușchii care se contractă liber și cei cărora li s-au atașat diferite greutăți. Este interesantă această observație deoarece se știe că lactatul crește evident în mușchii contractați.

După încetarea stimulărilor electrice, deci în relaxare, nivelul fosforilazei *a* revine rapid la nivelul de bază, indiferent dacă s-a stimulat un timp scurt sau un timp lung, deci dacă nivelul a fost mult crescut față de cel de bază sau sub el. Revenirea între limitele normale are loc după 40—60 s de la încetarea stimulărilor.

Inhibarea formării fosforilazei *a* prin prelungirea stimulării ridică o problemă delicată, deoarece în aceste condiții, lactatul continuă să crească, nu în ritmul inițial ridicat, dar totuși semnificativ. Acest fapt presupune întrebarea dacă așa-zisa „inactivitate" a fosforilazei *b* este reală.

Recent s-au adus dovezi în sprijinul ipotezei că fosforilaza *b* are un rol deosebit în glicogenoliză. Astfel, în urma constatărilor că fosforilaza se găsește numai sub forma *b* la o specie de șoareci (I/FnLn), s-a comparat formarea lactatului, glucozo-6-fosfatului și a fosforilazei în paralel cu o specie care conține fosforilaza *a* (C_{57}BL/FnLn) [78]. S-a constatat că, deși fosforilaza *a* este absentă (prin lipsa fosforilazei-*b*-kinaza din mușchii acestei specii de șoareci), totuși lactatul și glucozo-6-fosfatul cresc în funcție de timpul de stimulare, este adevărat într-o proporție redusă față de specia care conține fosforilaza *a*. Deci o dovadă evidentă că fosforilaza *b* a fost în acest caz responsabilă de declanșarea proceselor glicolitice.

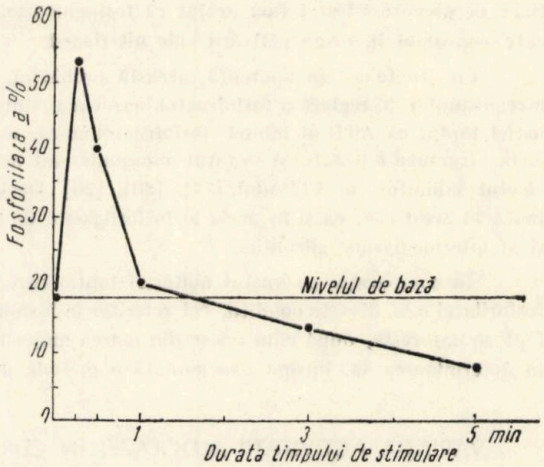


Fig. 5. — Variația procentului fosforilazei *a* în funcție de durata de stimulare.

O altă dovadă evidentă a participării directe a fosforilazei *g* în glicogenoliză este faptul că, prin creșterea concentrației de 5'-AMP și de fosfat anorganic și datorită scăderii concentrației de ATP, fosforilaza *b* devine activă [79]. Or, se știe că în timpul contracției musculare ATP-ul scade prin efectuarea unor contracții prelungite, ceea ce atrage după sine o creștere — este adevărat limitată — a AMP-ului și a fosfatului anorganic, suficientă însă pentru activarea fosforilazei *b*. În prezența AMP-ului ca activator, fosforilaza *b* poate scinda glicogenul aproape în aceeași proporție ca și fosforilaza *a* [80].

Aceste date, deși încă incomplete, ne permit să tragem concluzia că fosforilaza *a* este responsabilă de declanșarea unui ritm rapid, dar de scurtă durată, al glicogenolizei, în timp ce fosforilaza *b* acționează atît în repaus, cît și în eforturile prelungite cu un ritm lent și constant al glicogenolizei.

ROLUL FOSFOFRUCTOKINAZEI ÎN GLICOGENOLIZĂ

Asupra posibilității rolului său de reglare în cazul glicogenolizei a fost emisă o ipoteză încă din 1956 [81], însă primele dovezi experimentale evidente au fost aduse mult mai tîrziu [82], [83]. Cercetările ulterioare [84—86] au precizat rolul său de reglare în cursul contracției musculare în particular, și al glicolizei în general.

După cum am arătat, în urma stimulării mușchilor are loc o accelerare a producerii de lactat, care reprezintă o creștere a glicolizei de cîteva sute de ori față de nivelul mușchilor în repaus. În același timp, are loc o creștere marcată a fructozo-*1,6*-difosfatului, ceea ce indică o activitate crescută a fosfofructokinazei în mușchii care se contractă [34]. Această activare sub impulsul stimulărilor electrice nu are loc însă o dată cu primele contracții, ci numai după o anumită perioadă de timp [32], avînd deci inițial un rol de limitare a glicolizei. Acest efect de limitare jucat de fosfofructokinază se manifestă printr-o acumulare inițială de glucozo-*6*-fosfat (am arătat că fosfoglucoizomeraza nu are rol de reglare), care însă este consumat în urma activării sale ulterioare.

Cu toate că, în aparență, această problemă pare relativ lămurită, totuși asupra mecanismului de reglare a fosfofructokinazei mai sînt multe semne de întrebare. Se cunoaște astfel faptul că ATP-ul inhibă fosfofructokinaza, în timp de *5'*-AMP, ADP-ul, *3'*, *5'*-AMP ciclic, fructozo-*6*-fosfatul și fosfatul anorganic sînt activatori, putînd diminua sau chiar aboli efectul inhibitor al ATP-ului [79], [80], [26]. Deci, în ultimă instanță, un rol deosebit îl joacă în acest caz, ca și în acela al fosforilazei *b* de altfel, nivelul concentrației nucleotidelor și al intermediarilor glicolitici.

În comparație cu vastul material faptic care se poate găsi asupra variației nivelului fosforilazei *a* în diverse condiții, cel referitor la fosfofructokinaze este mult mai restrîns. Acest fapt se datorește, după cum reiese din marea majoritate a studiilor, dificultăților întîmpinate în determinarea sa, lipsind deocamdată o metodă precisă și simplă de dozare.

VARIAȚIA ACTIVITĂȚII ALDOLAZEI ÎN CURSUL CONTRACȚIEI MUSCULARE

Asupra participării acestei enzime, ca și în ceea ce privește variațiile cantitative ale activității sale în cursul contracției musculare, nu avem încă decît date extrem de limitate. Recent s-a arătat [30] că și aldolaza își modifică activitatea în urma stimulării electrice a mușchilor cu 5 imp/s (fig. 6). Activitatea este crescută după 30 și mai ales 60 de secunde de stimulare. Prin prelungirea duratei de stimulare, nivelul activității aldolazei revine între limitele determinate la mușchii în repaus.

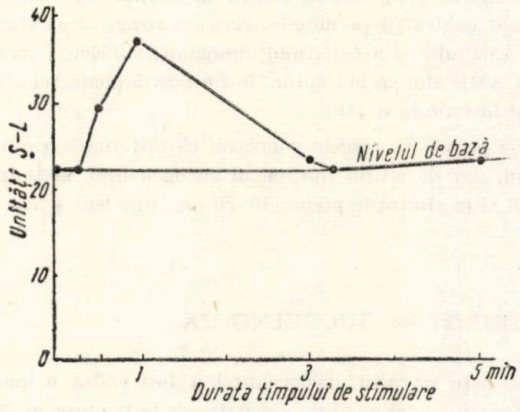


Fig. 6. — Nivelul aldolazei musculare în funcție de durata timpului de stimulare.

Acest fapt, creșterea aldolazei după o durată mai lungă de stimulare, denotă o anumită ritmicitate, un decalaj în ceea ce privește acțiunea fosforilazei *a*, a fosfofructokinazei și a aldolazei, condiționată, probabil, de concentrația substraturilor și a nucleotidelor din spațiile interfibrilare. Se impune un studiu comparativ, în aceleași condiții experimentale, al acestor trei enzime urmărite în perioade de stimulare diferite și prin aplicarea unui număr variabil de impulsuri pe secundă.

Mecanismul de reglare enzimatică a glicolizei

Despre această problemă actuală nu deținem încă multe informații, unele fiind doar simple interpretări teoretice, bazate pe datele științifice limitate existente. Cu toate acestea, rezultatele obținute în această direcție pot fi asamblate în mai multe categorii. Bineînțeles, din această clasificare didactică pe care o facem nu dorim să reiasă că nu există însă o strînsă interdependență. Avem certitudinea că datele ulterioare vor permite asamblarea și fundamentarea unei teorii care să poată explica printr-o singură interpretare multe dintre datele controversate de astăzi.

Caracterul allosteric al fosforilazei b. După cum am văzut, un rol deosebit în reglarea *in vivo* a unor enzime cu rol de reglare, ca cele enumerate pînă acum, îl deține concentrația ATP-ului, AMP-ului și a unor intermediari care le pot activa sau inhiba.

Recent [60], [87] s-a demonstrat rolul deosebit pe care îl joacă proteinele enzimatice allosterice. Una dintre acestea este și fosforilaza *b*, care, datorită acestei caracteristici speciale, poate produce o interacțiune între locurile specifice de legare ale substraturilor pe de o parte și ale activatorilor și inhibitorilor pe de altă parte [61]. Acest aspect al proteinelor enzimatice allosterice fiind foarte recent, nu avem date clare în ceea ce privește modul sau modurile de legare ale substratelor, activatorilor și inhibitorilor, dar este de subliniat că acest caracter allosteric este regăsit la enzimele-„cheie" din diverse procese metabolice. Prin aprofundarea acestei probleme se va explica, desigur, și multe dintre punctele neclare existente asupra modului de reglare enzimatică a glicolizei.

Compartimentalizarea substraturilor de enzime. În încercarea de a se lămuri modul diferit de acțiune a enzimelor din mușchii în repaus față de aceia în contracție s-a presupus că există o compartimentalizare, o barieră între substrat și enzimă. Existența acestei bariere presupune că în mușchii în repaus enzimele vor acționa asupra unei cantități limitate de substrat, aflat într-o concentrație care este doar necesară unei activități fiziologic normale, constante. În momentul în care mușchiul este obligat să facă față unei activități sporite, se produce o eliberare a unei cantități sporite de intermediar, ceea ce produce o accelerare a activității enzimatice.

Un caz tipic îl avem în cazul ionilor de calciu, care sînt „pompați" din reticulul sarcoplasmatic în sarcoplasmă sub impulsul stimulilor electrici [88]. Prin analogie, s-a ajuns la această ipoteză și în ceea ce privește intermediarii glicolitici, ca, de exemplu glucozo-*6*-fosfatul (26).

Tehnicile actuale nu permit încă să se precizeze justețea acestei ipoteze, existînd fie date care o atestă, fie unele care o pun la îndoială.

Formele duble ale enzimelor. Încă din 1956, Cori a emis ipoteza că unele enzime musculare pot coexista sub două forme distincte, dintre care una inactivă în repaus devine extrem de activă în timpul unei activități crescute. Această ipoteză se baza pe faptul că fosforilaza se găsește în mușchi sub cele două forme *a* și *b*, aflate, așa cum am văzut, într-un raport care diferă net în mușchii în repaus față de cei în contracție. Această ipoteză, care explică într-o oarecare măsură posibilitatea unei creșteri atît de intense și rapide a glicolizei din cursul contracției musculare, a primit confirmări recente. Astfel, au început să fie aduse dovezi în ceea ce privește existența unor forme duble ale fosfofructokinazei [89], [90], ale fosforilazei-*b*-kinazei și ale glicogen-sintetazei [91], [92].

Este interesant de subliniat că toate aceste enzime citate sînt cunoscute ca avînd un deosebit rol de reglare a activității glicolitice. Existența acestor forme duble explică în mod evident comportarea activității diferite a mușchilor în repaus față de a celor în contracție, cu toate că lasă în umbră o serie de probleme care pînă astăzi nu au putut fi încă lămurite. Nu se cunoște încă decît într-un mod foarte vag felul în care are loc acest mecanism de activare,

în ce mod se face această rapidă trecere dintr-o formă în alta, ce factori contribuie la această interconversiune.

Se cunoaşte, şi noi am amintit acest lucru, faptul că un rol deosebit îl joacă concentraţia unei întregi serii de substanţe care se găsesc în organism (AMP, ATP, 3',5'-AMP ciclic etc.). Deci cu cît se pătrunde mai mult în intimitatea acestor procese, cu atît explicarea lor devine mai complexă. Iată de ce biochimia acestor relaţii a devenit un obiect de studiu abordat din ce în ce de mai mulţi cercetători. De asemenea biochimia proceselor metabolice din muşchi a devenit o problemă actuală, reflectată prin imensul număr de lucrări care apar în fiecare an.

ÎNCHEIERE

După cum am văzut, în cursul glicolizei se formează dintr-un mol de glucoză 4 moli de ATP, dintre care 3 sînt utilizaţi în diferite „urgenţe" ale organismului. În comparaţie cu cei 36 de moli de ATP formaţi în cursul fosforilării oxidative dintr-un mol de glucoză, este evident că glicoliza constituie o sursă energetică mai mică. Cu toate acestea, ea joacă în angrenajul general metabolic al organismului, şi în particular al contracţiei musculare, un rol de frunte, ceea ce reiese din următoarele :

a) Fiind ciclul iniţial de reacţii al degradării glucidelor, este cel care reglează prin „pacemakers"-ii săi întreaga desfăşurare a proceselor de formare de ATP.

b) Este furnizoarea unui component principal al ciclului acizilor dicarboxilici, şi anume acidul piruvic, care, difuzînd în mitocondrii după decarboxilarea sa oxidativă, devine o „materie primă" a metabolismului aerob şi, indirect, al fosforilării oxidative.

c) Este succesiunea de reacţii care furnizează energia de imediată instanţă pentru diversele activităţi funcţionale ale organismului şi poate face faţă unei solicitări energetice urgente, însă de scurtă durată.

d) Blocarea activităţii glicolitice duce la perturbări care pot fi fatale organismului respectiv, şi acest fapt se datoreşte interrelaţiilor şi strînsei interdependenţe cu toate activităţile funcţionale principale, şi în special cu ciclul acizilor dicarboxilici şi fosforilarea oxidativă.

Datorită tuturor aceste considerente, glicoliza deţine un rol deosebit în procesul contracţiei musculare, iar desfăşurarea sa este condiţionată de integritatea întregului lanţ enzimatic. Glicoliza şi reglarea sa enzimatică constituie o problemă de actualitate, larg abordată de numeroşi cercetători din toată lumea, deoarece explicarea acestor procese va avea, fără îndoială, implicaţii largi în foarte multe domenii de activitate biochimică.

Datorită acestui lucru, am constiderat utilă elaborarea acestui referat general, în care au fost asamblate un număr ridicat din lucrările apărute pînă acum în această direcţie.

Mulţumesc lui Corneliu Medeşan pentru lectura şi sugestiile acordate în cursul redactării acestui articol.

Institutul de biochimie al Academiei Republicii Socialiste România

Prezentată la redacţie la 28 decembrie 1965

BIBLIOGRAFIE

1. D. M. Needham, R. K. Pillai, Biochem. J., **31**, 1837 (1937).
2. O. Meyerhof, W. Schulz, P. Schuster, Biochem, Z., **239**, 309 (1937).
3. P. L. Pedersen, J. Sacks, Arch. Biochem. Biophys., **109**, 197 (1965).

4. W. F. H. M. Mommaerts, Amer. J. Physiol., **183**, 585 (1955).
5. B. Chance, C. M. Connely, Nature, **179**, 1235 (1957).
6. A. Flekenstein, J. Janke, R. Davis, H. Krebs, Nature, **174**, 1081 (1954).
7. O. Cori, A. Traverso-Cori, M. Lagarrique, F. Marcus, Biochem. J., **70**, 633 (1958).
8. D. F. Cain, M. J. Kushmerick, R. E. Davies, Biochim. Biophys. Acta, **86**, 81 (1964).
9. A. L. Lehninger, J. biol. Chem., **190**, 345 (1951).
10. G. E. Boxer, T. M. Devlin, Science, **134**, 1495 (1961).
11. B. Saktor, Proc. XIth Intern. Congr. Entom., Viena, **3**, 180 (1960).
12. E. Zebe, A. Delbruck, T. Bücher, Biochem. Z., **331**, 254 (1959).
13. B. Saktor, A. Dick, J. biol. Chem., **287**, 3259 (1962).
14. B. Sacktor, *Sixth Intern. Congr. Biochem.*, New York, 1964.
15. Y. G. Topper, A. B. Hastings, J. biol. Chem., **179**, 1255 (1949).
16. M. F. Utter, K. Kurahasi, J. biol. Chem., **207**, 821 (1954).
17. H. A. Krebs, M. Woodford, Biochem. J., **94**, 436 (1965).
18. A. Omachi, N. Lifson, Amer. J. Physiol., **185**, 35 (1956).
19. F. G. Warnock, N. P. Inciardi, W. E. Wilson, Fed. Proc., **22**, 298 (1963).
20. M. Klingenberg, T. Bücher, Ann. Rev. Biochem., **29**, 669 (1960).
21. R. D. Peterson, D. Gaudin, R. M. Bocek, C. H. Beatty, Amer. J. Physiol., **206**, 599 (1964).
22. C. Liebecq, Bull. Soc. Chim. Biol., **43**, 313 (1961).
23. H. G. Hers, Biochim. Biophys. Acta, **8**, 416 (1952).
24. C. F. Cori, în *Enzymes*: *Units of biological structure and function*, sub redacţia O. H. Gaebler, Academic Press, New York, 1956, p. 573.
25. P. Ozand, H. T. Narahara, C. F. Cori, J. biol. Chem., **237**, 3037 (1962).
26. S. Karpatkin, E. Helmreich, C. F. Cori, J. biol. Chem., **239**, 3139 (1964).
27. O. Meyerhof, *Die chemischen Vorgänge im Muskel. Monographien aus dem Gesamtgebiet der Physiologie der Pflanzen und der Tiere*, J. Springer Verlag, Berlin, 1930.
28. D. Tănăsescu, St. cerc. biochim., **7**, 285 (1964).
29. A. Margreth, V. Muscatello, E. Andersson-Ledergren, Exp. Cell Res., **32**, 484 (1963).
30. D. Tănăsescu, St. cerc. biochim., **8**, 325 (1965).
31. Von Euler, E. Adler, G. Günther, H. Hellstrom, Hoppe-Zeyler Ztschr., **245**, 217 (1937).
32. J. Sacks, R. V. Ganslen, J. F. Difee, Amer. J. Physiol., **177**, 113 (1954).
33. P. Özand, H. T. Narahara, J. biol. Chem., **239**, 3146 (1964).
34. L. P. Pedersen, J. Sacks, Arch. Biochim. Biophys., **109**, 197 (1965).
35. R. E. Fischer, G. T. Cori, Amer. J. Physiol., **112**, 5 (1935).
36. H. J. Hohorst, în *Funktionelle und morphologische Organisation der Zelle*, editor P. Karlson, *Wissenschaftliche Konferenz der Gesellschaft Deutscher Naturforscher und Ärzte*, Springer Verlag, Berlin, 1963, p. 188.
37. E. G. Krebs, C. Gonzales, J. B. Posner, D. S. Love, G. E. Bratvold, E. H. Fischer, *CIBA Symposium on control of glycogen metabolism*, Edit. Churchill, Londra, 1964, p. 200.
38. G. J. Dixon, J. Sachs, Amer. J. Physiol., **193**, 129 (1958).
39. J. Sachs, M. G. Cleland, Amer. J. Physiol., **198**, 300 (1960).
40. E. Macovschi, C. Iordache, St. cerc. biochim., **5**, 207 (1962).
41. E. Macovschi, T. Rădulescu, L. Scolnic, St. cerc. biochim., **5**, 485 (1962).
42. W. F. H. M. Mommaerts, K. Seraydarian, G. Maréchal, Biochim. Biophys. Acta, **57**, 1 (1962).
43. C. F. Cori, G. T. Cori, Proc. Soc. exp. Biol. Med., **34**, 704 (1936).
44. G. T. Cori, C. F. Cori, J. biol. Chem., **158**, 321 (1945).
45. B. Illingwort, G. T. Cori, Biochem. Preparations, **3**, 1 (1953).
46. E. H. Fischer, I. H. Slater, J. Pharmac. exp. Therap., **122**, 480 (1958).
47. E. G. Krebs, E. H. Fischer, J. biol. Chem., **216**, 113 (1955).
48. E. H. Fischer, E. G. Krebs, J. biol. Chem., **216**, 121 (1955).
49. P. J. Keller, G. T. Cori, Biochim. Biophys. Acta, **12**, 235 (1953).
50. T. Barawowski, B. Illingworth, C. F. Brown, C. F. Cori, Biochim. Biophys. Acta, **25**, 16 (1957).
51. E. H. Fischer, D. J. Graves, E. G. Krebs, Federation Proc., **16**, 180 (1957).
52. E. H. Fischer, A. B. Kent, E. R. Snyder, E. G. Krebs, J. Amer. Soc., **80**, 2906 (1958).

53. A. A. Green, G. T. Cori, J. biol. Chem., **151**, 21 (1943).
54. E. G. Krebs, E. H. Fischer, Biochim. Biophys. Acta, **20**, 150 (1956).
55. E. G. Krebs, A. B. Kent, D. J. Graves, E. H. Fischer, *Proc. Intern. Symposium Enzyme Chemistry, Tokyo and Kyoto*, Pergamon Press, Londra, vol. 2, 1957, p. 41.
56. E. G. Krebs, D. J. Graves, E. H. Fischer, J. biol. Chem., **234**, 2867 (1959).
57. N. B. Madsen, J. biol. Chem., **223**, 1067 (1956).
58. N. B. Madsen, C. F. Cori, J. biol. Chem., **223**, 1055 (1956).
59. N. B. Madsen, F. R. N. Gurd, J. biol. Chem., **223**, 1251 (1956).
60. J. Monod, J. P. Changeux, G. Jacob, J. Mol. Biol., **6**, 306 (1963).
61. N. B. Madsen, Biochem. Biophys. Res. Comm., **15**, 390 (1964).
62. A. Harden, W. Young, Proc. Roy. Soc., **B 81**, 528 (1909).
63. P. Ostern, J. A. Guthke, J. Terszakowec, Z. Physiol. Chem., Hoppe-Seyler's, **243**, 9 (1936).
64. J. F. Taylor, în *Phosphorus Metabolism*, editor W. D. Mc Elroy, B. Glass, John Hopkins Press, Baltimore, vol. I, 1951, p. 104.
65. K. H. Ling, H. A. Lardy, J. Amer. Chem. Soc., **76**, 2842 (1954).
66. M. W. Slein, G. T. Cori, C. F. Cori, J. biol. Chem., **186**, 763 (1950).
67. O. Meyerhof, K. Lohmann, Biochem. Z., **271**, 89 (1934).
68. J. F. Taylor, A. A. Green, G. T. Cori, J. biol. Chem., **173**, 591 (1948).
69. A. H. Mahler, B. Bloom, Federation Proc., **19**, 86 (1960).
70. R. E. Benesh, H. A. Lardy, R. Benesh, J. biol. Chem., **216**, 663 (1955).
71. A. D. Swenson, P. D. Boyer, J. Amer. Chem. Soc., **79**, 2174 (1957).
72. W. J. Rutter, în *The Enzyme*, sub redacţia P. D. Boyer, H. Lardy, K. Myrbäck, Academic Press, New York, vol. 5, 1961, p. 341.
73. W. J. Rutter, S. V. Rieder, J. biol. Chem., **231**, 315 (1958).
74. Y. J. Topper, A. H. Mahler, B. Bloom, Science, **126**, 1287 (1957).
75. E. R. Drechsler, P. D. Boyer, A. G. Kowalsky, J. biol Chem., **234**, 2627 (1959).
76. W. H. Danforth, E. Helmreich, C. F. Cori, Proc. nat. Sci. U.S., **48**, 1191 (1962).
77. W. H. Danforth, E. Helmreich, J. biol. Chem., **239**, 3133 (1964).
78. W. H. Danforth, J. B. Lyon, J. biol. Chem., **239**, 4047 (1964).
79. H. E. Morgan, A. Parmeggiani, J. biol. Chem., **239**, 2435 (1964).
80. H. E. Morgan, A. Parmeggiani, J. biol. Chem., **239**, 2440 (1964).
81. H. A. Lardy, R. E. Parks Jr., în *Enzymes*: *Units of biological structure and function*, sub redacţia O. Gaebler, Academic Press, New York, 1956, p. 584.
82. J. V. Passonneau, O. A. Lowry, Biochim. Biophys. Res. Comm., **7**, 10 (1962).
83. T. E. Mansour, J. M. Mansour, J. biol. Chem., **237**, 629 (1962).
84. T. E. Mansour, J. biol. Chem., **238**, 2285 (1963).
85. D. M. Regen, D. A. B. Young, W. W. Davis, J. Jack Jr,, C. R. Park, J. biol. Chem., **239**, 381 (1964).
86. A. H. Underwood, E. A. Newsholme, Biochem. J., **95**, 868 (1965).
87. H. Helmreich, C. F. Cori, Proc. nat. Acad. Sci., **51**, 131 (1964).
88. A. Martonosi, R. Feretos, J. biol. Chem., **239**, 648, 659 (1964).
89. T. E. Mansour, Fed. Proc., **23**, 171 (1964).
90. E. Vinuela, M. L. Salas, A. Sols, Biochim. Biphys. Res. Comm., **15**, 243 (1964).
91. E. G. Krebs, D. S. Love, G. E. Bratvold, K. A. Trayser, W. L. Meyer, E. H. Fischer, Biochemistry, **3**, 1022 (1964).
92. W. H. Danforth, J. biol. Chem., **240**, 588 (1965).

L'antigénicité, sub redacţia lui BERNARD HALPERN, Editions Médicales Flammarion, Paris, 1963, 157 p., cu 51 de figuri şi 41 de tabele.

Colecţia de imunologie a Institutului Pasteur din Paris înregistrează printre lucrările mai importante volumul *L'antigénicité*, editat sub conducerea lui Bernard Halpern, profesor de medicină experimentală la Collège de France. Acest volum cuprinde o culegere de conferinţe ţinute de diferiţi oameni de ştiinţă din mai multe ţări în faţa studenţilor şi specialiştilor acestui institut.

Iniţiativa acestor conferinţe, ca şi a publicării lor într-un volum, aparţine profesorului B. Halpern, căruia îi revine meritul de a fi pus astfel la dispoziţia cercetătorilor interesaţi de fenomenul antigenicităţii informaţii complete asupra tuturor aspectelor pasionantei probleme a imunologiei. Aşa cum se afirmă chiar în prefaţa lucrării, volumul *L'antigénicité* nu este un curs sintetic sau didactic, deoarece fiecare conferenţiar a avut latitudinea să-şi spună punctul său de vedere în acel domeniu al antigenicităţii în care lucrările sale l-au consacrat ca specialist. Din această cauză, metoda, stilul de expunere variază de la un capitol la altul, unitatea cărţii fiind dată de rigurozitatea ştiinţifică cu care sînt tratate diversele aspecte ale problemei antigenicităţii.

Capitolul întîi, „Aspectele cantitative ale izo-hemaglutinării", este semnat de R. Wurmser, care expune sub acest titlu rezultatele obţinute într-o muncă de peste 15 ani.

Plecînd de la reversibilitatea aglutinării, cercetările autorului au arătat că serurile ce corespund unui fenotip sînt omogene din punctul de vedere al afinităţii aglutininelor şi că, în cazul serurilor imune, aglutininele sînt eterogene. Această eterogenitate depinde de genotipul individului care sintetizează aglutinina.

Aspectul antigenicităţii, ca problemă centrală, scapă la prima vedere în expunerea lui R. Wurmser, dar la o analiză atentă el reiese ca un corolar din cercetarea structurii, a aspectului cantitativ şi comportamentului *izo*-hemaglutininelor.

Capitolul al doilea, „Bazele structurale ale antigenicităţii", este elaborat de R. R. Porter, care subliniază două probleme fundamentale. Prima se referă la caracterele structurale ale unei molecule, care vor determina dacă această moleculă va stimula sau nu formarea anticorpilor la animale, adică dacă va fi sau nu imunogenă. A doua problemă priveşte posibilitatea de cunoaştere a structurilor moleculei de anticorpi, cărora molecula imunogenă le este complementară. R. R. Porter analizează în expunerea sa numai acest al doilea aspect şi reliefează faptul că rezolvarea acestei probleme ar fi interesantă nu numai ca atare, ci ar aduce şi completări importante la cunoaşterea naturii zonei de combinare a anticorpilor.

După ce expune o parte dintre realizările personale şi ale altor autori în studiul imunologic şi chimic al diferitelor substanţe proteice folosite ca antigene, autorul ajunge la ideea că nu se poate trage nici o concluzie generală privind natura zonei de combinare înainte de a se cunoaşte natura exactă a zonelor ce determină antigenicitatea substanţelor.

Capitolul al treilea, „Antigenicitatea unor poliozide şi grupările care determină specificitatea lor", cuprinde conferinţa ţinută de unul dintre cei mai competenţi imunochimişti,

E. A. Kabat. Autorul arată că, deşi se cunoaşte de mult activitatea antigenică a poliozidelor specifice din pneumococ la şoareci, această problemă prezintă totuşi un mare interes, în special datorită simplităţii structurii substanţelor. Tocmai această simplitate face să fie atît de atractiv studiul relaţiilor dintre specificitatea imunochimică şi structura poliozidelor.

E. A. Kabat arată că anticorpii posedă două zone specifice de combinare, care determină combinarea cu o parte a antigenului. Forţele care determină reacţia antigen-anticorp sînt : legăturile de hidrogen şi legăturile hidrofobe, forţele van der Waals şi sarcinile electrice. Aceste forţe acţionează numai la distanţe foarte mici şi, prin urmare, factorul important în reacţie este complementaritatea zonei specifice de combinare a anticorpilor cu determinantul antigenic. Ar fi foarte important deci să se cunoască mărimea determinantului antigenic şi a zonei de combinare specifice a anticorpilor. Un antigen ca dextranul, subliniază E. A. Kabat, format dintr-un singur fel de monozaharid, constituie un model ideal pentru studiul acestor probleme.

Rezultatele obţinute de E. A. Kabat l-au determinat să emită teoria apariţiei în serul imun a unei populaţii eterogene de anticorpi. Aceşti anticorpi au zone de combinare care reacţionează cu fragmente de dextran ce conţin pînă la 12—14 resturi de glucoză. Deosebit de interesante, cercetările lui E. A. Kabat au pus o trainică temelie la cunoaşterea problemei antigenicităţii.

Capitolul al patrulea, „Inhibiţia specifică a imunogenicităţii : toleranţa imunologică", cuprinde, sub semnătura lui A. Bussard, o expunere amplă asupra fenomenului de toleranţă imunologică. După prezentarea problemei, cu toate implicaţiile ei : inhibiţia specifică, paralizia imunologică şi inundaţia antigenică, autorul analizează diferitele tipuri de toleranţă imunologică la organismul tînăr şi adult, insistînd mai ales asupra toleranţei experimentale.

Fenomenul toleranţei experimentale se verifică în practică prin două teste : modul de dispariţie a antigenului şi lipsa apariţiei anticorpilor ; ambele teste fiind supuse în ultimă analiză sensibilităţii metodelor de dozare, A. Bussard conchide că nu se poate vorbi de un rezultat concludent decît în măsura concordanţei celor două teste.

Analizînd condiţiile cantitative ale toleranţei, autorul stabileşte un paralelism între cantitatea de antigen injectată şi numărul de celule imunologic competente ale animalului imunizat. A. Bussard consideră starea de imunitate ca o situaţie dinamică, deschizînd în acest mod noi perspective înţelegerii noţiunii de toleranţă imunologică.

Capitolul al cincilea, „Alotipia", este redactat de însuşi descoperitorul ei, J. Oudin, şi constituie unul dintre cele mai bune materiale din cadrul acestei culegeri. După J. Oudin, categoria de proteine cu o specificitate antigenică foarte puţin diferită constituie un grup de proteine alotipe, iar specificitatea alotipică este o specificitate antigenică ce permite distingerea unui alotip de altul.

Studiul analitic al alotipiei gammaglobulinelor de iepure şi legarea lui de determinismul genetic al specificităţii alotipice sînt analizate de J. Oudin cu multă competenţă, deducînd din experimentele de pînă acum o relaţie între alotipie şi structură. Alotipia este reprezentată în concepţia lui J. Oudin de modificări ale structurii primare a gammaglobulinelor studiate. Aceste cercetări permit o interpretare ştiinţifică a complexităţii antigenice ce se observă în cazurile de izoimunizare experimentală şi care într-un viitor nu prea îndepărtat ar putea fi aplicate şi în practica medicală.

Capitolul al şaselea, „Mecanismele exaltării antigenicităţii de către adjuvanţi", cuprinde conferinţa lui S. H. Stone, elev al lui J. Freund. Prezentarea mecanismului de acţiune a adjuvanţilor, făcută de autor, poate fi rezumată în trei puncte : 1) adjuvanţii formează un depozit din care antigenul difuzează lent spre ganglionii limfatici regionali ; 2) adjuvantul

poate transforma un antigen solubil într-unul particular, modificînd prin aceasta natura sa fizică şi influenţînd astfel producţia de anticorpi; 3) adjuvanţii exercită o acţiune directă asupra celulelor ce secretă anticorpi. Expunerea este concisă şi documentată, bazată însă mai mult pe fapte experimentale din literatură decît pe lucrări proprii.

Capitolul al şaptelea, „Aspectul biologic general al antigenicităţii unor bacterii anaerobe", poartă semnătura lui A. A. Prévot, care prezintă un studiu complex al antigenicităţii bacteriene şi scoate în relief legătura acestui studiu cu realizările practicii medicale. Autorul accentuează obligativitatea cunoaşterii structurii antigenice bacteriene ca factor hotărîtor în terapeutica infecţiilor microbiene.

Capitolul al optulea, „Studiul imunologic al pneumoconiozelor provocate de pulberile vegetale la om", de J. Pepys, J. L. Longbottom şi P. A. Jenkins, abordează natura reacţiilor de hipersensibilitate la om. Reiese din acest studiu că expunerile permanente la pulberi vegetale pot provoca la om o producţie mărită de anticorpi precipitanţi care au importanţă patogenică prin aceea că precipitinele pot declanşa reacţii anormale în ţesuturile interstiţiale.

Relatările autorilor sînt importante nu numai din punct de vedere terapeutic, ci şi din punctul de vedere al înţelegerii noţiunii de antigenicitate. Aceasta reiese limpede chiar numai din diversitatea antigenelor de origine vegetală, care ajung zilnic în organism la o anumită categorie de oameni. De ce nu toţi aceştia produc anticorpi sau nu-i produc în cantităţi cu implicaţii patologice rămîne încă de cercetat.

Capitolul al nouălea, „Reacţiile alergice cutanate la corpurile chimice simple", cu subtitlul „dermatite eczematoase alergice de contact la om", este semnat de M. B. Sulzberger. Autorul arată că dermatita eczematoasă alergică de contact constituie una dintre cauzele cele mai comune ale infirmităţii şi suferinţelor umane. Cercetările întreprinse de autor şi de colaboratorii săi au scos în relief rolul celulelor mononucleare în propagarea fenomenelor de alergie cutanată.

Valeriu V. Micuşan

Laboratorul de chimie biologică I, IMF — Bucureşti

„Studii şi cercetări de biochimie" publică articole originale, de nivel ştiinţific superior, din toate domeniile biochimiei. Sumarele revistei sînt completate cu alte rubrici, ca : *Viaţa ştiinţifică*, în care, prin scurte note, sînt aduse la cunoştinţă cititorilor unele manifestări ştiinţifice din domeniul biochimiei : congrese, simpozioane, consfătuiri, schimburi de experienţă între cercetătorii români şi cei străini etc. ; *Recenzii* — în care sînt prezentate cele mai recente lucrări de specialitate apărute în ţară şi peste hotare.

NOTĂ CĂTRE AUTORI

Autorii sînt rugaţi să înainteze articolele, notele şi recenziile dactilografiate la două rînduri. Tabelele vor fi dactilografiate pe pagini separate, iar diagramele vor fi executate în tuş, pe hîrtie de calc. Tabelele şi ilustraţiile vor fi numerotate cu cifre arabe. Figurile din planşe vor fi numerotate în continuarea celor din text. Se va evita repetarea aceloraşi date în text, tabele şi grafice. Explicaţia figurilor va fi dactilografiată pe pagină separată. Citarea bibliografiei în text se va face în ordinea numerelor. Numele autorilor va fi precedat de iniţiale. Titlurile revistelor citate în bibliografie vor fi prescurtate conform uzanţelor internaţionale.

Autorii au dreptul la un număr de 50 de extrase, gratuit.

Responsabilitatea asupra conţinutului articolelor revine în exclusivitate autorilor.

Corespondenţa privind manuscrisele, schimbul de publicaţii etc. se va trimite pe adresa Comitetului de redacţie : str. Docenţilor, nr. 20, Bucureşti 2, Raionul 30 Decembrie.

1966 JUL 12

Lucrări apărute în Editura Academiei Republicii Socialiste România

IONEL HAIDUC, **Introducere în chimia ciclurilor anorganice**, 339 p., 16 lei.

C. D. NENIŢESCU, I. P. CANTUNIARI şi I. G. DINULESCU, **Nomenclatura chimiei organice**, 96 p., 3,65 lei.

ILIE VASILESCU, **Enzimele**, 429 p., 22,80 lei.

R. PORTOCALĂ şi N. I. IONESCU, **Microscopia electronică în biologie şi inframicrobiologie**, 180 p., 9,90 lei.

C. VELICAN, DOINA VELICAN şi N. CARP, **Histochimia mucopolizaharidelor**, 284 p. + 24 pl., 20 lei.

C. BODEA şi colab., **Tratat de biochimie vegetală**, vol. I, 747 p. + 4 pl. + 2 pl. color, 41 lei.

I. CANTACUZINO, **Opere alese**, 687 p. + 4 pl. color, 44 lei.

ST. CERC. BIOCHIMIE, TOMUL 9, NR. 2, P. 121 — 228, BUCUREŞTI, APRILIE 1966

I. P. Informaţia. — c. 3151

43 816

Lei 12. —

E 1330

studii şi cercetări de biochimie

3

TOMUL 9

1966

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

St. cerc. biochimie, tomul 9, nr 3, 229—336, Bucureşti, iulie 1966

COMITETUL DE REDACŢIE

Redactor responsabil:

ACADEMICIAN E. MACOVSCHI

Redactor responsabil adjunct:

H. SLUŞANSCHI

Membri:

S. OERIU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; EUGENIA SORU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; M. MEZINCESCU, I. VASILESCU, TR. RĂDULESCU, VICTORIA ALEXANDRESCU.

Secretar de redacţie:

VICTOR GHEŢIE

Revista apare de 4 ori pe an.

Preţul unui abonament anual este de 48 lei.

În ţară abonamentele se fac la oficiile poştale, agenţiile poştale, factorii poştali şi difuzorii voluntari din întreprinderi şi instituţii.

Orice comandă din străinătate (numere izolate sau abonamente) se face prin: CARTIMEX, Căsuţa poştală 134—135, Bucureşti, Republica Socialistă România, sau prin reprezentanţii săi din străinătate.

Manuscrisele, cărţile şi revistele pentru schimb, precum şi orice corespondenţă se vor trimite pe adresa comitetului de redacţie al revistei „Studii şi cercetări de biochimie"

ADRESA REDACŢIEI:
Bucureşti, str. Docenţilor nr. 20
Raionul 30 Decembrie

E 1330

STUDII ŞI CERCETĂRI DE
BIOCHIMIE

Tomul 9 (1966) Nr. 3

SUMAR

Pag.

E. MACOVSCHI, Materia vie şi premize ale unei teorii moleculare a memoriei 231

I. BRAD, Contribuţii la studiul biochimiei rezistenţei la ger a cerealelor de toamnă. IV. Studiul comparativ al conţinutului în zahăr direct reducător şi total la cerealele de toamnă, în timpul iernii. 249

M. CÂRSTEANU, Exosmoza sodiului, potasiului şi calciului din pielea umană în diferite stări patologice 263

N. ŞT. CHIŞIU, Cenzura proteinoclazică în absorbţia de proteine şi polipeptide din intestin 269

D. COTARIU şi TR. RĂDULESCU, Deplasarea potasiului şi sodiului din muşchiul striat de broască în contracţie liberă şi contracţie cu travaliu mecanic 277

G. DINESCU, Modificarea proprietăţilor chimice ale citocromului *c* sub acţiunea unor substanţe citostatice alchilante 283

D. MOŢET, Cercetarea imunochimică a înglobării fracţiunilor proteice din serul sanguin uman în coacervatul cu acacia. Consideraţii asupra mecanismului de formare a coacervatelor 289

L. SCOLNIC, Exosmoza substanţelor reducătoare în diferite stări funcţionale ale muşchiului (Notă preliminară) 299

I. SZÁNTAY şi D. DUMITRAŞCU, Aspecte ale metabolismului metioninei-^{35}S în enteropatii 305

REFERATE GENERALE

V. GHEŢIE, Sinteza proteinelor de rezervă în cursul coacerii seminţelor 311

O. FODOR, F. BARBARINO, D. GRIGORAŞ, A. NICOARĂ şi S. COTUL, Comportarea enzimelor serice sub acţiunea unor măsuri terapeutice în hepatita cronică. Bazele fiziopatologice şi limitele interpretării modificărilor enzimatice 325

St. cerc. biochimie, tomul 9, nr. 3, p. 229— 336, Bucureşti, iulie 1966

ST. CERC. BIOCHIM., 9, 3, p. 231–248 (1966)

MATERIA VIE ŞI PREMIZE ALE UNEI TEORII MOLECULARE A MEMORIEI

ACADEMICIAN PROF. DR. **EUGEN MACOVSCHI**

577 : 616. 89

Rezumat. — În vederea intuirii unui mecanism biochimic al recepţionării stimulilor, precum şi al înregistării şi reproducerii urmelor experienţei trecute, s-a procedat la conexarea unei concepţii noi despre structura materiei vii cu principiile tehnicilor de recepţionare, înregistrare şi reproducere a sunetelor. Această conexare este justificată de cibernetică, conform căreia aspectele esenţiale ale funcţionării organismelor şi maşinilor pot fi subsumate aceloraşi scheme abstracte, fizice şi matematice. Astfel s-a ajuns la elaborarea unor premize ale unei teorii moleculare a memoriei, care permit explicarea mecanismului biochimic al diferitelor fenomene psihice, ca apariţia amintirilor, amneziilor, iluziilor, halucinaţiilor etc., pe baza particularităţilor structurii materiei vii şi a funcţiilor mnezice ale componentelor acestei materii. Totodată, aceste elemente teoretice duc la interpretarea acţiunii farmacologice a unor substanţe psihotrope, sugerează unele posibilităţi de cercetare experimentală în domeniul biochimiei, fiziologiei şi patologiei sistemului nervos central şi permit aprofundarea concepţiei cu privire la funcţiile biologice pe care diferitele substanţe le exercită atunci cînd, în calitate de componente ale materiei vii, fac parte integrantă din structura acesteia.

Urmele experienţei trecute, acumulate şi ascunse în memorie, pot reapare în conştiinţa noastră fie voit, fie spontan, datorită unor factori a căror natură încă nu este prea lămurită. Mai mult : sub acţiunea unor substanţe ca alcoolul, eterul, morfina şi altele, precum şi în anumite îmbolnăviri ale sistemului nervos central, pot să apară anomalii în recepţionarea stimulilor, precum şi în înregistrarea şi reproducerea urmelor experienţei trecute, condiţionînd la rîndul lor perturbări temporare sau permanente ale memoriei. Aceste perturbări stau la baza unor maladii mintale care, datorită răspîndirii lor, „reprezintă una dintre problemele majore ale societăţii" [1, p. 490].

Se înţelege că perfecţionarea progresivă a tratamentelor maladiilor mintale necesită, între multe altele, cunoaşterea din ce în ce mai aprofundată a biochimismului lor, deci şi a fenomenelor biochimice care stau la baza memoriei. Cu toate acestea, pînă acum „nimeni nu a încercat să elaboreze o ipoteză mai mult sau mai puţin amplă cu privire la bazele moleculare ale memoriei" [2, p. 343]. Chiar dacă „există unele date experimentale restrînse în favoarea ipotezei că acidul ribonucleic ar reprezenta molecula care codifică legătura condiţionată — memoria — totuşi

datele respective sînt criticate din punctul de vedere al modului cum sînt interpretate, iar ipoteza ca atare nu poate explica nici mecanismul procesului de memorare, nici modul de păstrare a urmelor lăsate de experienţa trecută şi nici modalitatea reproducerii lor" [2, p. 344].

Alte ipoteze cu privire la memorie, pe care le vom cita după A. Perot [3, p. 358], nu cuprind aspecte biochimice. „Sistemele cele mai vechi de explicare tratează amintirile ca obiecte bine individualizate, care s-ar acumula în unele circumvoluţii ale creierului". Metafora „polipierul de imagini" şi, apoi, aceea a plăcii sensibile, după inventarea fotografiei, ilustrează bine această concepţie simplistă. Mai tîrziu, s-a părut că amintirile nu pot fi efectiv puse în rezervă şi că orice evocare este o reconstituire, dar acest proces de resinteză implică permanenţa materialelor, a urmelor, resturi ale experienţelor trecute : ele au fost numite engrame (Seman, 1904).

„O altă serie de ipoteze este bazată pe cibernetică : se compară funcţionarea creierului cu aceea a unor maşini electronice, evidenţiind în ambele cazuri existenţa unor circuite susceptibile de a se acorda. Maşinile pot fi „educate", pot reţine informaţiile, pot „învăţa" seriile, pot recunoaşte figurile. Pînă la ce punct însă aceste analogii pot fi considerate ca explicaţii, nu s-a putut încă determina".

Deşi complexitatea manifestărilor activităţii nervoase superioare îngreunează cunoaşterea bazelor biochimice ale memoriei, totuşi substratul lor poate fi intuit dacă se ţine seama atît de noua concepţie despre structura materiei vii, prezentată în lucrările anterioare [4—9], cît şi de principiile generale ale tehnicii de recepţionare, înregistrare şi reproducere a sunetelor, folosită curent în fizica aplicată.

În ceea ce priveşte noua concepţie despre natura şi structura materiei vii, reţinem următoarele ei aspecte caracteristice, care nu numai că o deosebesc fundamental de concepţiile actuale, dar prezintă o importanţă deosebită pentru elaborarea unei teorii moleculare a memoriei :

1. Protoplasma este formată din două feluri de materie, cu structuri şi însuşiri profund diferite — materie vie şi materie nevie — care se întrepătrund şi se află în relaţii de coexistenţă funcţională şi transformabilitate reciprocă [4 *a*, p. 158, 159 şi 163 ; *b*, p. 13 şi 16] [5, p. 470 şi 471].

2. Structura materiei vii se află pe o treaptă superioară de organizare în comparaţie cu structura materiei nevii din protoplasmă şi reflectă stadiul superior — biologic — al dezvoltării materiei. În această structură specială, superioară oricărei structuri chimice, componentele sînt unite prin legături corelative, care fac ca structura materiei vii să apară ca un întreg, la care modificările sau deformările, provocate de agenţii externi sau interni la nivelul unora dintre componente, se transmit altor componente şi se repercutează asupra întregii structuri [7, *a*, p. 259 şi 260 ; *b*, p. 194—196].

3. Moleculele substanţelor, devenite prin asimilaţie componente ale materiei vii, prezintă în noua lor calitate însuşiri şi stări deosebite de cele pe care le-au avut înainte de asimilaţie ; devenite mai bogate în energie şi deformate (înţelegîndu-se prin deformare orice modificare, indiferent de natura ei, care se produce la nivelul componentelor materiei vii sub influenţa interacţiunilor cu alte componente ale acestei materii), aceste componente exercită în structura materiei vii anumite funcţii legate de manifestarea fenomenelor vieţii (funcţii biologice), pe care nu le pot exercita atunci cînd, ca molecule, se află în

afara structurii acestei materii [7, *a*, p. 257–260; *b*, p. 192–195]. Printre astfel de funcţii au fost examinate pînă acum unele funcţii cibernetice ale componentelor fosfolipidice şi proteice din materia vie [6, *a*, p. 7 şi 8; *b*, p. 8].

4. Fosfolipidele în calitate de componente ale structurii materiei vii, se comportă cu totul altfel decît în calitate de molecule aflate în materia nevie a protoplasmei. Datorită celor două funcţii organice capabile să reacţioneze între ele: gruparea fosforică şi gruparea colinică sau

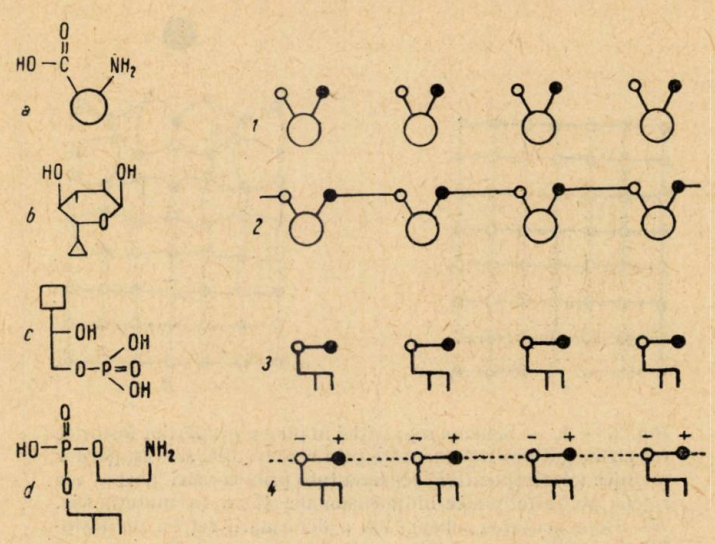


Fig. 1. — Schemele structurilor chimice ale moleculelor de aminoacizi (*a*), monozaharide (*b*), nucleotide (*c*) şi fosfolipide (*d*). Fiecare dintre aceste molecule conţine două funcţii organice capabile să reacţioneze între ele. Dacă una dintre aceste funcţii se notează simbolic printr-un cerc negru, iar cealaltă printr-un cerc alb, atunci simbolurile din rîndul 1 reprezintă fie aminoacizi, fie monozaharide, fie nucleotide, iar simbolul din rîndul 2 reprezintă biopolicondensatul respectiv, adică polipeptidul, polizaharidul sau polinucleotidul, ale cărui verigi sînt unite prin legături covalente. În cazul fosfolipidelor (rîndul 3), biopolicondensatul ce se formează în structura materiei vii este bazat pe stabilirea legăturilor ionice dintre verigile lanţului polifosfolipidic (rîndul 4).

colaminică, componentele fosfolipidice pot forma în structura materiei vii — prin intermediul legăturilor ionice — un fel de „biopolicondensate fosfolipidice" sau „polifosfolipide" (noţiune nouă pentru biochimie), întocmai după cum moleculele de aminoacizi, monozaharide şi nucleotide — care de asemenea cuprind cîte două funcţii organice capabile să reacţioneze între ele, prin intermediul legăturilor covalente — formează biopolicondensatele corespunzătoare (greşit numite biopolimeri), cum sînt polipeptide, polizaharide, respectiv polinucleotide (fig. 1). Pe cînd însă moleculele acestor din urmă biopolicondensate au un aspect filiform, avînd în principiu o structură unidimensională, legăturile de tip ionic care se stabilesc între componentele fosfolipidice ale materiei vii permit

realizarea nu numai a unor lanţuri filiforme unidimensionale, dar şi a unor reţele bi- şi poate chiar tridimensionale (fig. 2). Mai mult : legăturile ionice între verigile lanţurilor şi reţelelor polifosfolipidice conferă acestor formaţiuni o deosebită sensibilitate, care le permite să participe la cele mai rapide fenomene biologice care se produc în protoplasma vie. De aceea, polifosfolipidele existente în structura materiei vii se deosebesc profund prin structura şi însuşirile lor de aşa-zişii biopolimeri de natură proteică, poliozidică şi polinucleică [7, *a*, p. 263 şi 264 ; *b*, p. 198—200].

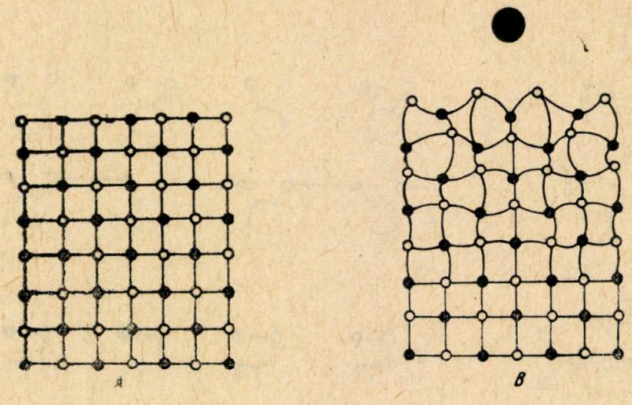


Fig. 2. — *A*. — Schema repartiţiei în plan a grupărilor fosforice (electronegative) reprezentate prin cercuri albe şi a grupărilor aminice (electropozitive) reprezentate prin cercuri negre, ale reţelei polifosfolipidice bidimensionale aflate în materia vie. *B*. — Reprezentarea schematică a deformării reţelei polifosfolipidice bidimensionale din materia vie sub influenţa unui cation, reprezentat printr-un cerc mare negru.

La acestea, trebuie adăugat că datorită numărului mare al diferitelor fosfolipide care pot intra în alcătuirea componentelor polifosfolipidice ale materiei vii şi posibilităţii formării structurilor uni-, bi- şi chiar tridimensionale, cantitatea de informaţie care poate fi acumulată în astfel de formaţiuni este de-a dreptul fantastică, depăşind cu mult pe aceea din moleculele principial unidimensionale ale acizilor nucleici, formate numai din patru tipuri de nucleotide.

5. Materia vie există numai în protoplasma vie ; o dată cu moartea protoplasmei, structura acestei materii se destramă, iar componentele ei redevin molecule, adică revin la starea pe care au avut-o înainte de asimilaţie [4, *a*, p. 162 şi 163 ; *b*, p. 16] [7, *a*, p. 255 şi 258 ; *b*, p. 191 şi 194] [8, *a*, p. 402 ; *b*, p. 317].

Această concepţie despre structura materiei vii şi despre funcţiile biologice pe care le exercită componentele acestei materii poate fi conexată cu principiile tehnicii de recepţionare, înregistrare şi reproducere a sunetelor în vederea intuirii unui mecanism biochimic atît al recepţionării stimulilor, cît şi al înregistrării şi reproducerii urmelor experienţei trecute. O astfel de conexare este justificată deoarece, conform principiilor ciberneticii, aspectele esenţiale ale funcţionării organismelor şi maşinilor pot fi subsumate aceloraşi scheme abstracte, fizice şi matematice.

RECEPŢIONAREA STIMULILOR

Receptorii fiziologici pot fi comparaţi cu sursele de sunete. O sursă de sunet (de exemplu : un clopot) sub acţiunea unui stimul (lovire) intră în vibraţie şi face să apară într-un mediu adecvat (de exemplu : aerul) deformaţii reversibile, numite oscilaţii sonore, care se propagă în mediul respectiv cu o anumită viteză. Se poate admite că şi receptorii fiziologici (de exemplu : receptorii vizual, acustic şi alţii) sub acţiunea stimulului

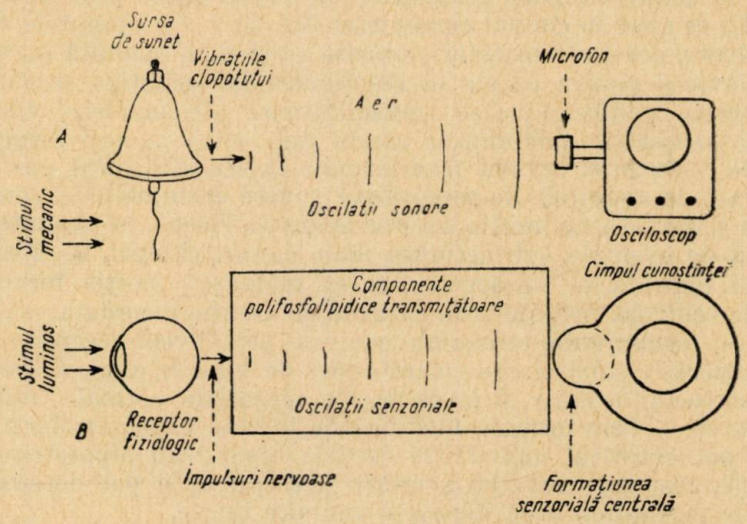


Fig. 3. — Comparaţie între schemele care reprezintă pe de o parte (*A*) producerea şi recepţionarea sunetelor (recepţia acustică), iar pe de altă parte (*B*) producerea şi recepţionarea stimulilor (recepţie senzorială).

adecvat produc impulsuri nervoase pe care le trimit în anumite celule ale sistemului nervos central şi fac să apară în componentele materiei vii din acele celule (de exemplu : în componentele polifosfolipidice) deformări reversibile pe care le putem numi oscilaţii sau impulsuri senzoriale şi care se propagă în componentele respective cu o anumită viteză. Ipoteza că unele componente polifosfolipidice ar reprezenta mediul în care se propagă oscilaţiile senzoriale este lesne de admis, dacă se ţine seama că, dintre diferitele componente ale materiei vii, tocmai ele ar fi în stare să reacţioneze practic instantaneu, prin deformări reversibile şi sincrone, la impulsurile nervoase care vin de la receptorii fiziologici. Cum aceste componente polifosfolipidice transmit mai departe, prin oscilaţii senzoriale, informaţia primită de la receptorii fiziologici, li se poate atribui denumirea de componente polifosfolipidice transmiţătoare (fig. 3)*.

* Atît reprezentarea schematică din figura 3, cît şi cele din figurile următoare urmăresc scoaterea în evidenţă numai a rolului funcţional al diferitelor părţi şi componente ale aparatului neural de recepţionare a stimulilor, precum şi de înregistrare şi reproducere a urmelor experienţei trecute, nu şi ordinea lor succesivă sau aranjarea reciprocă, acestea putînd fi cu totul altele decît cele indicate în scheme.

De existența oscilațiilor sonore în aer putem afla nu numai cu urechea, ci și cu ajutorul unor aparate de recepționat sunete (de exemplu : un microfon cuplat cu un osciloscop), care reacționează la oscilațiile respective, semnalîndu-ne prezența lor prin transformare în anumite manifestări sesizabile într-un fel sau altul (de exemplu : în imaginile care apar pe ecranul osciloscopului și care sînt sesizate cu ochiul). La fel poate fi și cazul oscilațiilor senzoriale : de existența lor în componentele polifosfolipidice transmițătoare ale materiei vii aflăm cu ajutorul unor formațiuni senzoriale centrale (de exemplu : centrul optic, centrul acustic) care reacționează la aceste oscilații, semnalîndu-ne prezența lor prin transformare în senzații ce apar în cîmpul cunoștinței (fig. 3). Ca și aparatele de recepționat sunete, aceste formațiuni nervoase au și ele o anumită inerție, care trebuie învinsă pentru ca ele să reacționeze la oscilațiile senzoriale din componentele polifosfolipidice transmițătoare ale materiei vii. Astfel, oscilațiile senzoriale subliminare rămîn fără efect asupra formațiunilor senzoriale centrale și nu sînt transformate în senzații, după cum nu pot fi detectate de aparatele de recepționat sunete acele oscilații sonore care sînt prea slabe față de inerția acestor aparate. Totuși, în anumite împrejurări, ca de exemplu sub acțiunea unor factori chimici, metabolici sau patologici capabili să micșoreze sau să mărească inerția formațiunilor senzoriale centrale, precum și în cazurile de atenție încordată sau în lipsă de atenție, formațiunile senzoriale centrale pot deveni receptive la oscilațiile senzoriale subliminare (manifestări de hiperestezie), respectiv pot deveni nereceptive chiar și la oscilațiile senzoriale normale (manifestări de hipoestezie). Prin urmare, modificările inerției formațiunilor senzoriale centrale pot constitui una dintre cauzele hiper- sau hipoesteziei, adică a creșterii, respectiv scăderii acuității perceptive, și pot determina tulburări ale percepției, dacă depășesc anumite limite.

Intensitatea oscilațiilor sonore care se propagă într-un mediu omogen (de exemplu : aerul) depinde nu numai de intensitatea de vibrație a sursei de sunet care le provoacă, dar și de starea mediului respectiv. Se știe doar că aceeași intensitate de vibrație a sursei de sunet provoacă oscilații mai slabe în aerul rarefiat decît în cel comprimat. Mai mult : neomogenitatea mediului poate modifica direcțiile și modul de propagare a oscilațiilor sonore, ceea ce poate duce la denaturarea și deformarea efectului lor acustic. Putem deci admite că și intensitatea oscilațiilor senzoriale care se propagă prin componentele polifosfolipidice transmițătoare din materia vie depinde nu numai de intensitatea impulsului nervos care le provoacă, dar și de starea în care se află în acel moment componentele menționate ; de asemenea, se poate admite că propagarea oscilațiilor senzoriale depinde de gradul de neomogenitate a structurii pe care o formează componentele polifosfolipidice transmițătoare. Înseamnă că factorii metabolici, chimici, patologici etc., capabili să influențeze direct sau indirect starea componentelor polifosfolipidiice transmițătoare din materia vie și gradul de neomogenitate a structurii acestora, pot, modifica într-un sens sau altul intensitatea și propagarea oscilațiilor senzoriale. Atîta timp cît aceste modificări nu depășesc limitele normale, oscilațiile senzoriale exercită asupra formațiunilor senzoriale centrale efectele obișnuite, provocînd senzații normale. Dacă însă modificările amintite depășesc anumite limite, atunci efectele oscilațiilor senzoriale

respective asupra formaţiunilor senzoriale centrale devin anormale, traducîndu-se fie prin întărirea sau slăbirea senzaţiilor, dacă modificarea stării componentelor polifosfolipidice transmiţătoare provoacă modificări în intensitatea oscilaţiilor senzoriale, fie prin denaturarea şi deformarea senzaţiilor, dacă modificarea gradului de neomogenitate a structurii componentelor menţionate provoacă alterarea propagării oscilaţiilor senzoriale (fig. 4).

În primul caz, oscilaţiile senzoriale de intensitate mărită sau micşorată determină o intensificare, respectiv o slăbire a senzaţiilor, chiar

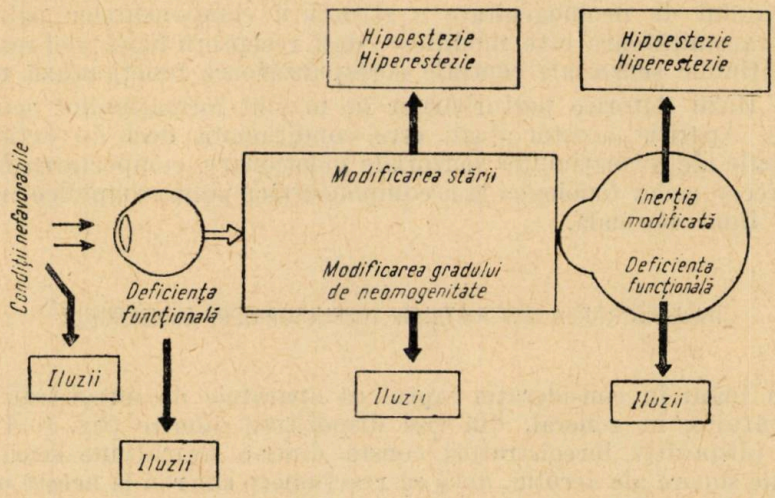


Fig. 4. — Reprezentarea schematică a relaţiilor dintre stările funcţionale anormale ale aparatului neural de recepţie senzorială şi apariţia atît a iluziilor, cît şi a manifestărilor de hipo- şi hiperestezie.

şi atunci cînd inerţia formaţiunilor senzoriale centrale rămîne normală. Prin urmare, modificarea stării componentelor polifosfolipidice transmiţătoare poate constitui o altă cauză a manifestărilor de hiper- sau hipoestezie (fig. 4).

În cazul al doilea, oscilaţiile senzoriale, perturbate în propagarea lor, determină denaturarea şi deformarea senzaţiilor, chiar dacă formaţiunile senzoriale centrale respective funcţionează normal. Or „percepţiile reale, însă denaturate şi deformate de omul care le primeşte, se numesc iluzii" [3, p. 288]; în cadrul lor „omul alterează calitatea obiectului perceput prin senzaţii; după împrejurări, el îl amplifică sau îl animează şi-i atribuie imagine, contururi şi culori pe care nu le are" [3, p. 288]. Prin urmare, modificarea gradului de neomogenitate a structurii componentelor polifosfolipidice transmiţătoare poate constitui una din cauzele apariţiei iluziilor (fig. 4).

După cauzele de care sînt produse, iluziile pot fi împărţite în patru categorii (fig. 4):

1) Iluzii datorite condiţiilor de percepţie nefavorabile (de exemplu: ceaţa, distanţa mare, lumina insuficientă etc.). În acest caz, receptorul fiziologic trimite spre sistemul nervos central impulsuri nervoase viciate,

producătoare de iluzii, deşi atît receptorul respectiv cît şi întregul aparat neural de recepţionare a stimulilor funcţionează normal.

2) Iluzii datorite stării funcţionale anormale a receptorului fiziologic. În acest caz, receptorul fiziologic trimite spre sistemul nervos central impulsuri nervoase viciate, cu toate că sînt bune condiţiile de percepţie şi restul aparatului neural de recepţionarea stimulilor se află în stare normală de funcţionare.

3) Iluzii datorite perturbărilor la nivelul componentelor polifosfolipidice transmiţătoare. După cum s-a arătat, aceste iluzii apar atunci cînd, sub acţiunea diferiţilor factori — chimici, metabolici, patologici etc. — gradul de neomogenitate a structurii componentelor polifosfolipidice transmiţătoare este modificat, deşi receptorii fiziologici respectivi şi formaţiunile senzoriale centrale corespunzătoare funcţionează normal.

4) Iluzii datorite perturbărilor la nivelul formaţiunilor senzoriale centrale. Apariţia acestor iluzii este condiţionată deci de deficienţele funcţionale ale formaţiunilor senzoriale menţionate, comportarea funcţională a receptorilor fiziologici şi a componentelor polifosfolipidice transmiţătoare fiind normală.

ÎNREGISTRAREA OSCILAŢIILOR (IMPULSURILOR) SENZORIALE

Să luăm în consideraţie faptul că aparatele de înregistrat sunete sînt alcătuite, în general, din trei dispozitive diferite (fig. 5 *A* şi *B*). Primul (dispozitiv înregistrator) constă dintr-o formaţiune sensibilă la oscilaţiile sonore ale aerului, aptă să reacţioneze sincron la aceste oscilaţii prin anumite deformări reversibile (membrana fonografului, membrana microfonului de la magnetofon) şi capabilă să le transforme (să le traducă) în acţiuni (deplasări mecanice ale acului fonografului, semnale electrice ale microfonului de la magnetofon) ce pot deforma într-un mod corespunzător şi nereversibil materialul adecvat pe care se face înregistrarea. Dispozitivul al doilea (dispozitiv purtător) constă dintr-un strat de material care, sub acţiunea primului dispozitiv, se deformează nereversibil (ceara fonografului, materialul feromagnetic uşor magnetizabil şi capabil să păstreze timp îndelungat starea magnetică); stratul acesta este aplicat pe un suport nedeformabil (cilindrul fonografului, banda flexibilă a magnetofonului). În fine, dispozitivul al treilea (dispozitiv motor) constă dintr-un mecanism (motor cu arc, electromotor cu dispozitivul de antrenare a benzii magnetofonului) care deplasează dispozitivul purtător în faţa dispozitivului înregistrator, ceea ce constituie condiţia esenţială a înregistrării informaţiei acustice. Uniformitatea vitezei acestei deplasări şi sensul ei unic sînt alte două condiţii importante pentru o înregistrare bună.

Să admitem că înregistrarea oscilaţiilor (impulsurilor) senzoriale necesită şi ea trei dispozitive analoge. Atunci, primul dispozitiv (dispozitivul neuro-*înregistrator*) ar trebui să fie alcătuit dintr-o formaţie sensibilă la oscilaţiile senzoriale ale componentelor polifosfolipidice din materia vie, aptă să reacţioneze sincron la aceste oscilaţii prin anumite deformări reversibile şi capabilă să le transforme (să le traducă) în acţiuni ce pot deforma într-un mod corespunzător şi nereversibil materialul adecuat pe care se

face înregistrarea. Dispozitivul al doilea (dispozitiv neuro-*purtător*) ar trebui să fie alcătuit dintr-o succesiune a acelor componente ale materiei vii care, fiind sensibile la acţiunile primului dispozitiv, ar prezenta posibilităţi de deformare nereversibilă ; aceste componente ar trebui să fie orînduite de-a lungul altor componente, capabile să constituie un suport nedeformabil. În fine, cel de al treilea dispozitiv (dispozitivul neuro-*motor*) ar urma să fie alcătuit dintr-un mecanism capabil să realizeze deplasarea dispozitivului purtător în faţa dispozitivului înregistrator, asigurînd astfel

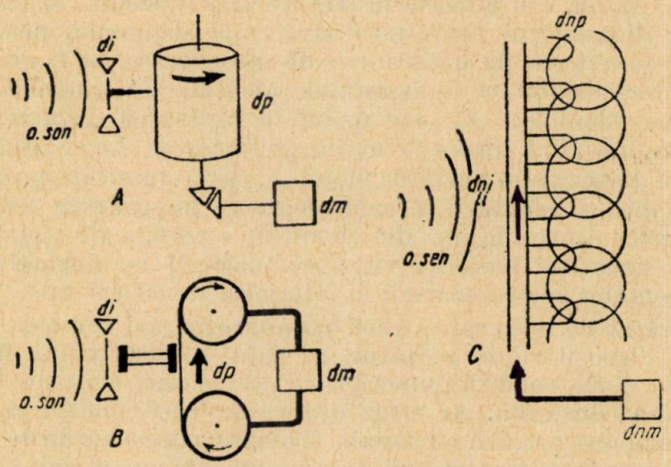


Fig. 5. — Schemele aparatelor de înregistrat sunete :

A — fonograf ; *B* — magnetofon. În schemele *A* şi *B* : *di* — dispozitiv înregistrator (nemobil) ; *dp* — dispozitiv purtător (mobil) ; *dm* — dispozitiv motor ; *o. son.* — oscilaţiile sonore. Schema *C* a aparatului neural de înregistrat oscilaţiile senzoriale : *dni* — dispozitiv neural de înregistrare (mobil) ; *dnp* — dispozitiv neuropurtător (nemobil) ; *dnm* — dispozitiv neuromotor ; *ii* — impuls de înregistrare ; *o.sen* — oscilaţii senzoriale.

posibilitatea înregistrării informaţiei senzoriale. Or, o deplasare în interiorul structurii materiei vii a unei formaţiuni alcătuite din numeroase componente este de neconceput fără deranjarea şi chiar destrămarea structurii din care face parte formaţiunea respectivă. Înseamnă că dispozitivul neuro-purtător, alcătuit din numeroase componente ale materiei vii, purtătoare ale informaţiei senzoriale înregistrate, nu poate fi mobil. Dar, tot din acelaşi motiv, nici dispozitivul neuro-înregistrator nu ar putea fi mobil dacă şi el ar fi alcătuit din anumite componente ale materiei vii. Cum însă deplasarea unuia dintre cele două dispozitive în faţa celuilalt reprezintă condiţia esenţială a unei înregistrări, şi cum dispozitivul neuro-purtător în orice caz este imobil, înseamnă că mobil trebuie să fie dispozitivul neuro-înregistrator, dar atunci el nu poate fi alcătuit din componente ale materiei vii. Printre sistemele mobile care nu sînt alcătuite din componente ale materiei vii, şi care apar în celulele nervoase în anumite împrejurări, sînt impulsurile nervoase. S-ar putea deci ca funcţia dispozitivului neuro-înregistrator să fie asigurată de impulsuri nervoase speciale, impulsuri de înregistrare, capabile nu numai să parcurgă structura materiei vii de-a lungul componentelor dispozitivului neuro-

purtător, dar să şi acţioneze asupra lor, asigurînd astfel înregistrarea senzorială (fig. 5, *C*).

Concluzia de mai sus reprezintă una din soluţiile posibile ale problemei. Într-adevăr, impulsurile nervoase de înregistrare pot îndeplini funcţiile de dispozitiv neuro-înregistrator, dacă admitem că aceste impulsuri sînt sensibile la oscilaţiile senzoriale, că răspund la aceste oscilaţii prin modulaţii sincrone şi reversibile ale parametrilor lor şi că pot acţiona asupra componentelor adecvate deformabile din dispozitivul neuro-purtător, imprimîndu-le deformaţii nereversibile, corespunzătoare modulaţiilor menţionate. Astfel, din punctul de vedere al comportării şi mecanismului de acţiune, dispozitivul neuro-înregistrator al sistemului nervos central, reprezentat funcţional de impulsurile de înregistrare, ar fi analog cu dispozitivul înregistrator al fonografului, alcătuit din membrana şi acul respectiv, cu deosebirea că este mobil în raport cu dispozitivul neuro-purtăror fix, pe cînd dispozitivul înregistrator al fonografului este fix în raport cu dispozitivul purtător mobil. Această deosebire poate fi privită ca o consecinţă a adaptării mecanismului de înregistrare senzorială din sistemul nervos central la una din condiţiile esenţiale ale vieţii : păstrarea integrităţii structurii materiei vii, incompatibilă cu deplasări mecanice ale componentelor acestei materii în interiorul structurii sale.

S-a arătat că asigurarea unei bune înregistrări acustice necesită ca deplasarea dispozitivului purtător în faţa dispozitivului înregistrator să satisfacă două condiţii importante : să se facă într-un singur sens şi cu o viteză constantă. Ar urma deci ca aceleaşi condiţii să fie satisfăcute şi în cazul înregistrării senzoriale, şi anume : impulsurile de înregistrare să parcurgă structura materiei vii de-a lungul componentelor dispozitivului neuro-purtător totdeauna în acelaşi sens şi cu aceeaşi viteză constantă. Din acest punct de vedere este de remarcat că, în conformitate cu datele cunoscute în fiziologia sistemului nervos, impulsurile nervoase satisfac ambele condiţii. Într-adevăr, aceste impulsuri se propagă de obicei într-un singur sens şi cu anumite viteze constante [10, p. 55].

Posibilitatea formării oscilaţiilor senzoriale în componentele polifosfolipidice transmiţătoare ale materiei vii, ca răspuns la impulsurile senzoriale primite de la receptorii fiziologici, a fost admisă pe baza ideii că legăturile de tip ionic între verigile lanţurilor şi reţelelor polifosfolipidice fac ca tocmai aceste componente ale materiei vii, şi nu altele, să fie acelea care să poată participa la cele mai rapide fenomene biologice care se produc în protoplasma celulelor nervoase. Or, tot din aceleaşi motive putem admite că şi materialul pe care se imprimă informaţia senzorială transmisă de dispozitivul neuro-înregistrator are şi el la baza lui componente de natură polifosfolipidică, sensibile la modulaţiile parametrilor impulsurilor de imprimare şi capabile să răspundă la aceste modulaţii prin deformări sincrone corespunzătoare. Pe cînd însă la componentele polifosfolipidice transmiţătoare ale informaţiei senzoriale deformările sînt reversibile, trecătoare, şi se propagă rapid ca oscilaţii (impulsuri) senzoriale, la componentele polifosfolipidice purtătoare, pe care se imprimă informaţia senzorială, deformările trebuie să fie nereversibile. Se poate admite că această deosebire de comportare se datoreşte deosebirilor de structură, în sensul că componentele polifosfolipidice transmiţătoare reprezintă formaţiuni necuplate funcţional cu alte componente

ale materiei vii, sau cuplate cu componente care nu îndeplinesc funcţii mnezice, pe cînd componentele polifosfolipidice purtătoare fac parte din complexe polifosfolipidoprotinonucleice în care fiecăreia dintre cele trei categorii de constituenţi îi revin roluri diferite în înregistrarea şi păstrarea informaţiei senzoriale, şi anume : polifosfolipidele sînt componentele pe care se face înregistrarea informaţiei senzoriale, proteinele sînt compo-

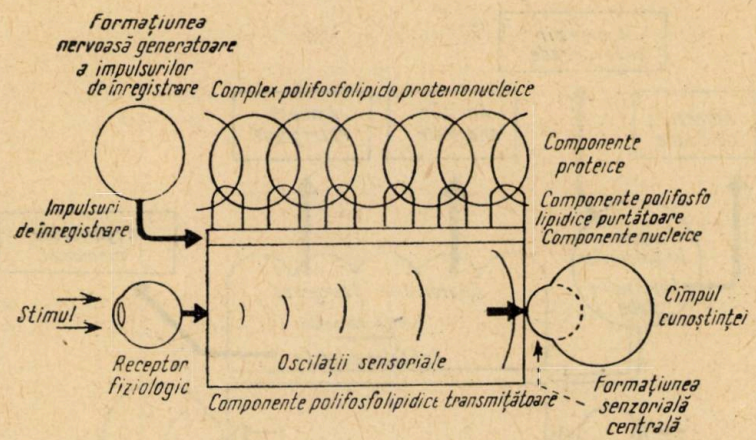


Fig. 6. — Schema aparatului neural de înregistrare a oscilaţiilor (impulsurilor) senzoriale.

nentele care fixează această informaţie şi stabilizează deformările produse la nivelul polifosfolipidelor, împiedecînd revenirea lor la starea dinainte de înregistrare, iar componentele nucleice sînt formaţiuni de-a lungul cărora se orînduiesc primele două categorii de componente. Astfel, din punct de vedere structural şi funcţional, complexele polifosfolipidoproteonucleice cu rol mnezic din sistemul nervos central pot fi comparate cu benzile de magnetofon : materialul feromagnetic pe care se înregistrează informaţia acustică corespunde componentelor polifosfolipidoproteice pe care se înregistrează informaţia senzorială, iar materialul flexibil, care serveşte ca suport pentru materialul feromagnetic, corespunde componentelor nucleice care servesc ca suport pentru componentele polifosfolipidoproteice (fig. 6).

Din cele de mai sus rezultă că componentele polifosfolipidice ale materiei vii din celulele nervoase pot îndeplini funcţii mnezice diferite, alcătuind fie materialul transmiţător, fie materialul purtător al informaţiei senzoriale.

După cum în neuniformităţile şanţului imprimat de ac în ceara cilindrului fonografului, respectiv în neregularităţile stării magnetice de pe banda magnetofonului, este cuprinsă informaţia acustică codificată, care ascunde în ea sunetele o data produse (fonograma), tot aşa şi în deformările imprimate în starea componentelor polifosfolipidice ale complexelor polifosfolipidoproteinonucleice de impulsurile de înregistrare este cuprinsă informaţia senzorială codificată, care ascunde în ea senzaţiile o dată trăite (senzograme).

Posibilitatea păstrării timp cît mai îndelungat a unei fonograme în stare bună, care să permită reproducerea acustică fidelă a sunetelor înregistrate, depinde atît de calitatea și starea materialului pe care s-a realizat înregistrarea, cît și de condițiile în care se păstrează fonograma. Materialul necorespunzător, ca și condițiile de păstrare neadecvate, duc la degradarea progresivă a fonogramelor, pînă cînd acestea devin neutilizabile.

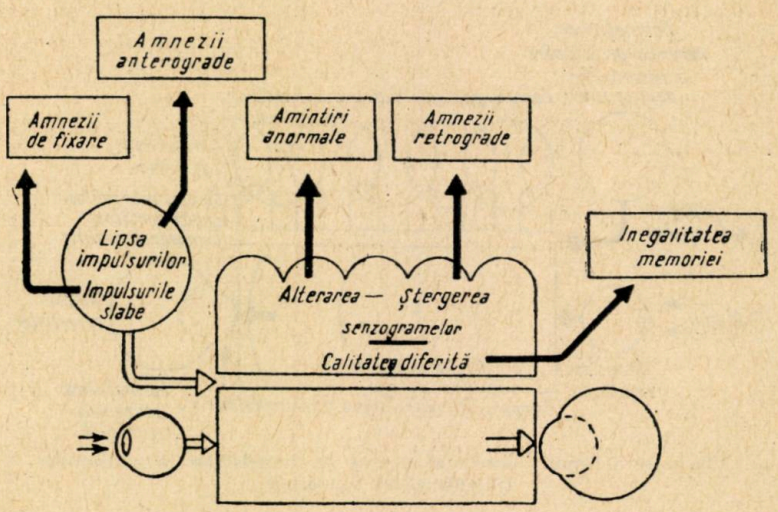


Fig. 7. — Reprezentarea schematică atît a relațiilor dintre stările funcționale anormale ale aparatului neural de înregistrare a oscilațiilor senzoriale și manifestarea diferitelor amnezii, cît și a raporturilor dintre calitatea complexelor polifosfolipidoproteinonucleice și inegalitatea memoriei.

Putem admite aceeași situație și în cazul senzogramelor. Într-adevăr, starea și calitatea complexelor polifosfolipidoproteinonucleice purtătoare ale senzogramelor depind de factorii metabolici care contribuie nu numai la biosinteza acestor complecși, dar și la păstrarea lor în structura materiei vii. Or, activitatea factorilor metabolici variază în funcție de împrejurări și condiții locale (starea organismului în momentul respectiv, antecedentele ereditare, deosebirile de metabolism în diferite regiuni ale creierului etc.). Rezultă că complexele polifosfolipidoproteinonucleice, formîndu-se și existînd în condiții diferite, pot fi de calități diferite, chiar dacă se găsesc în unul și același organism : cele de calitate superioară permit realizarea ușoară a unor senzograme bune și durabile, pe cînd cele de calitate inferioară dau senzograme slabe și de durabilitate redusă. Astfel, inegalitatea calității complexelor polifosfolipidoproteinonucleice explică inegalitatea și particularitățile capacității mnezice a oamenilor (inegalitatea memoriei) și dependența acestei capacități de o mulțime de factori externi și interni (fig. 7).

Durabilitatea senzogramelor depinde, între altele, de rezistența materialului complexului polifosfolipidoproteinonucleic față de tendința de revenire de la starea deformată la cea normală, nedeformată, dinainte de înregistrare. Această tendință este însă cu atît mai slabă cu cît gradul

de deformare este mai mic, ceea ce înseamnă că pe măsura trecerii timpului, deformările caracteristice ale senzogramelor devenind tot mai puțin pronunțate, tind asimptotic spre zero, fără însă a-l atinge vreodată. Poate în acest sens trebuie înțeleasă afirmația lui Bergson că „nu există uitare totală" [3, p. 358].

Situația se schimbă radical în acele cazuri patologice la care perturbările metabolice profunde duc nu numai la alterarea structurii complexelor polifosfolipidoproteinonucleice, însoțită de desfigurarea senzogramelor cuprinse în ele, dar chiar și la ștergerea totală a senzogramelor. În primul caz, amintirile apar sub aspecte anormale chiar și după vindecare, producînd confuzii în viața psihică a omului respectiv. În cazul al doilea, bolnavul va manifesta amnezia retrogradă, în cadrul căreia „sînt uitate evenimentele trăite înainte de boală" [3, p. 358] (fig. 7).

Urma magnetică lăsată pe o bandă de magnetofon în timpul imprimării acustice este alcătuită din anumite deformări nereversibile ale stării materialului feromagnetic aflat pe bandă; ea este invizibilă și poate fi pusă în evidență numai în condițiile funcționării magnetofonului. Nu este exclus ca situația să fie similară și în cazul urmei lăsate pe componentele polifosfolipidice purtătoare din materia vie în timpul înregistrării senzoriale; această urmă, reprezentată prin anumite deformări nereversibile ale stării componentelor menționate, poate fi invizibilă și susceptibilă de a fi pusă în evidență numai în condițiile de funcționare a sistemului nervos central. De aceea, sînt puține șanse ca astfel de deformări să poată fi puse în evidență prin mijloace biochimice actuale. Cum însă admitem că dispozitivul neuro-purtător este alcătuit din componente de natură diferită (polifosfolipidice, proteice și nucleice) și cum componentele structurii materiei vii sînt unite prin legături corelative, înseamnă că deformările survenite la nivelul unora dintre ele se pot transmite și celorlalte. Prin urmare, deformările normale — care apar în cursul înregistrării impresiilor curente — rămîn probabil la nivelul componentelor polifosfolipidice purtătoare ale complexelor menționate. Deformările mai puternice, survenite în cursul înregistrării unor senzații deosebite și mai ales a senzațiilor repetate care duc la elaborarea reflexelor condiționate, se pot însă extinde și asupra componentelor proteice — și chiar nucleice — ale dispozitivului neuro-purtător, repercutîndu-se, în funcție de împrejurări, asupra biochimismului celulelor nervoase și deci asupra cantității și chiar calității unora dintre componentele biochimice celulare. Dacă astfel de modificări sînt suficient de accentuate, ele pot deveni sesizabile prin cercetări biochimice corespunzătoare. Poate în acest sens ar urma să fie interpretate unele rezultate experimentale după care educarea duce la apariția unor modificări în cantitatea și chiar calitatea acidului ribonucleic din celulele nervoase ale creierului [11—14].

Concluzia că funcția unui dispozitiv neuro-înregistrator din celulele sistemului nervos central este asigurată de impulsuri nervoase speciale rezolvă și problema naturii dispozitivului neuro-motor. Într-adevăr, în condițiile de mai sus dispozitivul acesta nu poate fi alcătuit decît din formațiuni capabile să genereze impulsurile de înregistrare (fig. 6).

Este evident că de buna funcționare a centrelor nervoase generatoare a impulsurilor de înregistrare depinde însăși posibilitatea înregistrării senzațiilor. Astfel: se poate întîmpla ca apariția unei senzații să nu fie

însoțită de generarea impulsurilor de înregistrare sau ca aceste impulsuri să fi fost prea slabe pentru a asigura înregistrarea normală. Atunci impresia nu va fi înregistrată în memorie și de aceea nu ne vom aminti niciodată de ea. Aceasta ar fi explicația amneziilor anterograde, în care „uitarea șterge amintirea evenimentelor pe măsură ce ele se produc" [3, p. 358], respectiv a amneziilor de fixare, în cadrul cărora „evenimentele trăite par că nu au lăsat urme în memorie" [3, p. 358] (fig. 7.)

De asemenea, se înțelege că substanțele care stimulează, respectiv inhibă activitatea formațiunilor nervoase generatoare ale impulsurilor de înregistrare, vor activa procesul de fixare în memorie a diferitelor senzații, respectiv îl vor inhiba.

Ideile expuse permit intuirea următorului mecanism de funcționare a aparatului neural de înregistrare a oscilațiilor (impulsurilor) senzoriale. Sub acțiunea stimulilor corespunzători, receptorii fiziologici trimit spre anumite celule ale sistemului nervos central impulsurile nervoase purtătoare de informație. Aceste impulsuri acționează asupra componentelor polifosfolipidice transmițătoare din materia vie a acelor celule, provocînd apariția oscilațiilor (impulsurilor) senzoriale, care se propagă prin componentele menționate în întreaga structură a acestei materii. La rîndul lor, oscilațiile senzoriale acționează atît asupra formațiunilor senzoriale centrale corespunzătoare, provocînd apariția senzațiilor, cît și asupra impulsurilor înregistratoare generate de formațiunile nervoase respective, provocînd modularea parametrilor acestor impulsuri. Datorită modulațiilor produse la nivelul impulsurilor de înregistrare, informația senzorială transmisă prin oscilațiile senzoriale se înregistrează pe componentele polifosfolipidice purtătoare din materia vie, sub forma unor deformări nereversibile, iar senzograma astfel realizată se păstrează apoi în memorie (fig. 6).

REPRODUCEREA OSCILAȚIILOR (IMPULSURILOR) SENZORIALE

Să luăm în considerație faptul că reproducerea sunetelor necesită participarea celor trei dispozitive care servesc la înregistrare : dispozitivul motor pune în mișcare dispozitivul purtător și-l deplasează uniform în fața dispozitivului de înregistrare, care de data aceasta funcționează ca dispozitiv reproducător. Astfel, deformările nereversibile de pe materialul adecvat al dispozitivului purtător (șanțul de pe cilindrul fonografului, starea magnetică a materialului feromagnetic de pe banda magnetofonului) transmit informația codificată cuprinsă în ele dispozitivului reproducător care, răspunzînd la ele prin deformări reversibile, provoacă apariția oscilațiilor sonore corespunzătoare în aerul cu care vine în contact. Aceste oscilații sînt recepționate fie de ureche, fie de aparate de recepționat sunete, care, într-un fel sau altul, ne dezvăluie prezența lor.

Să admitem că reproducerea oscilațiilor senzoriale necesită de asemenea participarea celor trei dispozitive care servesc la înregistrare. Dispozitivul neuro-motor, prin formațiunile sale nervoase, generează impulsurile de reproducere și le trimite în celulele nervoase în care sînt senzogramele. Aceste impulsuri, parcurgînd structura materiei vii de-a lungul componentelor purtătoare ale senzogramelor, sînt influențate de

deformările nereversibile și stabile ale senzogramelor și răspund la ele prin modulații ale parametrilor lor. Aceste modulații se repercutează asupra stării componentelor polifosfolipidice transmițătoare ale materiei vii, provocînd în ele apariția oscilațiilor senzoriale, iar acestea, la rîndul lor, acționează asupra formațiunilor senzoriale centrale respective care le transformă în senzații. Astfel, senzațiile o dată înregistrate, reapar în conștiința noastră fie voit — cînd impulsul de reproducere reprezintă consecința unui act voluntar, fie spontan — cînd impulsul de reproducere

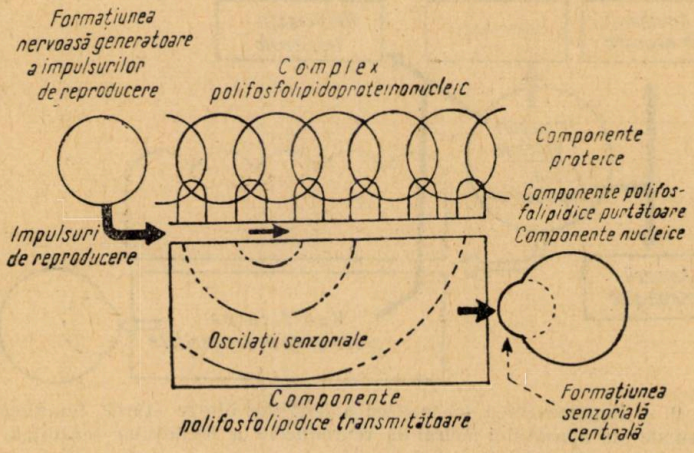


Fig. 8. — Schema aparatului neural de reproducere a oscilațiilor senzoriale.

este generat de formațiunea nervoasă respectivă sub acțiunea unor factori independenți de voință (fig. 8).

Faptul că amintirile pot fi evocate ori de cîte ori dorim înseamnă nu numai că impulsurile de reproducere sînt generate în funcție de voință, dar și că sînt dirijate voit pentru a parcurge anumite senzograme în care este înregistrată codificat informația amintirilor respective.

Se poate întîmpla ca impulsurile de reproducere să nu fie generate în momentul cînd dorim, ci să apară mai tîrziu sau să nu apară deloc. Atunci se manifestă amnezia de evocare, în cadrul căreia „amintirea — deși a fost memorată normal — nu poate fi chemată să apară în cîmpul conștiinței în momentul dorit" [3, p. 359].

Se mai poate întîmpla ca, din diferite motive de ordin metabolic sau patologic impulsurile nervoase de reproducere să nu poată fi generate în acele regiuni ale creierului în care sînt localizate anumite senzograme sau să nu poată ajunge la ele. În asemenea cazuri avem de a face cu amnezii neurologice care — după J. Delay — cuprind „afaziile" (uitarea vorbirii), „apraxiile" (uitarea gesturilor) și „agnoziile" (uitarea percepțiilor) [3, p. 359] (fig. 9).

În fine, în mecanismul de reproducere a oscilațiilor (impulsurilor) senzoriale poate fi căutată explicația halucinațiilor. Într-adevăr, halucinațiile ar putea reprezenta consecințele unei generări spontane și independente de voință, a unor impulsuri de reproducere care, străbătînd

pe neașteptate anumite senzograme, provoacă apariția unor senzații. Aceste senzații, suprapunîndu-se peste senzațiile curente, reale, dau impresia că și ele corespund realității actuale. După specificul formațiunilor nervoase generatoare ale impulsurilor menționate și a sensogramelor parcurse de impulsurile respective, se pot produce halucinații optice, acustice, tactile etc. Acțiunea halucinogenă a anumitor substanțe ca : mescalina, dietil-amida acidului lisergic (LSD 25), bufotenina, psilocibina, ca și aceea a altor substanțe psihodisleptice [15, p. 204—205] poate fi explicată

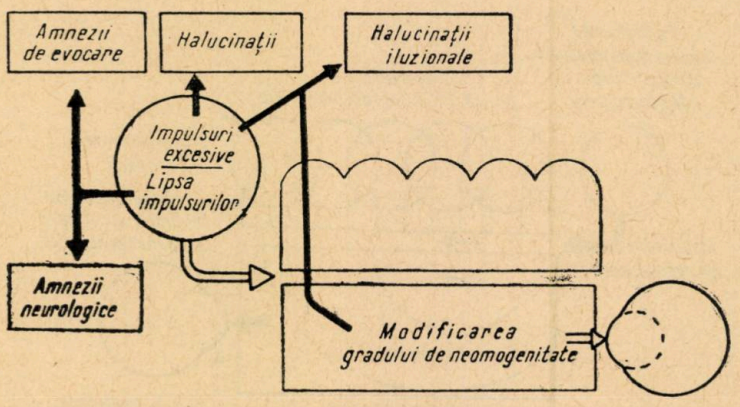


Fig. 9. — Reprezentarea schematică a relațiilor dintre stările funcționale anormale ale aparatului neural de reproducere a oscilațiilor senzoriale și manifestarea halucinațiilor și a unor amnezii.

prin influența excitantă exercitată de aceste substanțe asupra formațiunilor nervoase generatoare de impulsuri de reproducere.

Dacă admitem că tulburarea iluzională depinde în primul rînd de modificarea gradului de neomogenitate a componentelor polifosfolipidice transmițătoare, pe cînd tulburarea halucinogenă este condiționată în primul rînd de hiperactivitatea formațiunilor nervoase generatoare ale impulsurilor de reproducere, rezultă că mecanismele celor două tulburări psihice sînt diferite și numai în cazul cînd ambele tulburări se produc simultan se ajunge la „halucinații iluzionale" (fig. 9).

Se înțelege că factorii care pot influența calitatea structurii și modul de funcționare al aparatului neural de recepționare a stimulilor, precum și de înregistrare și reproducere a oscilațiilor senzoriale, se pot repercuta asupra memoriei și posibilităților de elaborare și păstrare a reflexelor condiționate. În această ordine de idei menționăm, de exemplu, unele din acele cercetări după care introducerea în creier a preparatelor de ribonuclează poate duce la dispariția reflexelor condiționate și la dificultăți în elaborarea reflexelor condiționate noi [16] [17] [2, p. 345].

ÎNCHEIERE

În cadrul acestei prezentări generale a premizelor unei teorii moleculare a memoriei nu au putut fi luate în considerație toate legăturile între partea ei biochimică și numeroasele fapte cunoscute în domeniul psihiatriei și al farmacodinamiei substanțelor psihotrope. Aceste aspecte

vor forma obiectul altor lucrări. Este de remarcat totuşi că teoria cu privire la rolul structurii materiei vii în recepţionarea stimulilor, precum şi în înregistrarea şi reproducerea oscilaţiilor senzoriale, cu toate imperfecţiunile inerente începutului:

1. Permite explicarea mecanismului unora dintre fenomenele psihice care se produc în sistemul nervos central, arătîndu-se substratul lor biochimic şi punîndu-se accentul pe componentele polifosfolipidice ale materiei vii.

2. Permite interpretarea acţiunii farmacologice a unor substanţe psihotrope, cu precizarea locului lor de acţiune.

3. Sugerează unele probleme noi de cercetare în unele domenii ale biochimiei, fiziologiei şi patologiei sistemului nervos central, pe baza legării fenomenelor psihice de particularităţile structurii materiei vii.

4. Aprofundează concepţia cu privire la funcţiile biologice pe care diferitele substanţe le pot exercita atunci cînd, în calitate de componente, sînt integrate în structura materiei vii.

Este evident că, în momentul de faţă, premizele teoretice enunţate reprezintă doar începutul unor investigaţii care nu epuizează sfera complexă a procesului psihic, dar care îi oferă o serie de indicaţii ce urmează a fi încorporate într-o posibilă sinteză asupra bazelor moleculare ale conservării şi valorificării experienţei umane.

Prezentat la redacţie la 30 martie 1966

Institutul de biochimie al Academiei Republicii Socialiste România
şi
Catedra de biochimie a Universităţii Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. J. C. Krantz, C. J. Carr, *Pharmacologie. Principles of medical practice*, Ed. 6, Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1965.
2. O. A. Krilov, V. S. Tongur, R. A. Danilova, *Priroda sledovih iavlenii (pameati) v vissih otdelah mozga*, Uspehi sovr. biol., **60**, 336 (1965).
3. A. Porot, *Manuel alphabétique et thérapeutique*, Presses Universitaires de France, Paris, 1965.
4. E. Macovschi, (*a*) *Materia vie şi geneza ei*, în *Colecţia „Materialismul dialectic şi ştiinţele contemporane ale naturii"*, Edit. politică, Bucureşti, 1959, p. 155.
(*b*) *Die lebende Materie und ihre Entstehung*, Revue de Chimie, **IV**, 11 (1959).
5. — *Materia vie şi rolul ei în hibridarea plantelor*, St. cerc. biochim., **6**, 467 (1963).
6. — (*a*) *Unele aspecte cibernetice în problema structurii materiei vii*, St. cerc. biochim., **7**, 5 (1964).
(*b*) *Nekotortie aspekti kibernetiki i struktura jivoi materii*, Rev. roum. biochim., **1**, 5 (1964).
7. — (*a*) *Unele probleme ale mecanismelor de reglare şi ale structurii materiei vii*, St. cerc. biochim., **8**, 253 (1965).
(*b*) *Some problems of regulation mechanisms and of living matter structure*, Rev. roum. biochim., **2**, 189 (1965).
8. — (*a*) *Materia vie şi distribuţia asimetrică a electroliţilor între protoplasmă şi lichidul interstiţial. (Bazele teoriei structurii şi compararea lor cu bazele teoriilor membranei şi sorbţiei)*, St. cerc. biochim., **8**, 371 (1965).
(*b*) *Living matter and the asymmetrical distribution of electrolytes between protoplasm and interstitial fluid. (Basis of the theory of structure as compared to the basis of membrane and sorption theories)*, Rev. roum. biochim., **2**, 285 (1965).
9. — (*a*) *Teoria structurii şi repartiţia electroliţilor între lichidul de perfuzie şi muşchii trenului posterior de broască*, St. cerc. biochim., **9**, 2 (1966).

(*b*) *The structure theory and the electrolyte distribution between the perfusion fluid and the frog hind limb muscles*, Rev. roum. biochim., **3**, 2 (1966).
10. A. KREINDLER, V. VOICULESCU, *Anatomia şi fiziologia clinică a sistemului nervos central*, Edit. Academiei R.P.R., 1957.
11. H. HYDEN, E. EGYHAZI, *Nuclear RNA changes of nerve cells during a learning experiment in rats*, Proc. Nat. Acad. Sci., **48**, 1366 (1962).
12. H. HYDEN, E. EGYHAZI, *Glyal RNA changes during a learning experiment in rats*, Proc. Nat. Acad. Sci., **49**, 618 (1963).
13. H. HYDEN, E. EGYHAZI, *Changes in RNA content and bases composition in cortical neurons of rats in a learning experiment involving transfer of handedness*, Proc. Nat. Acad. Sci., **52**, 1030 (1964).
14. H. HYDEN, *Beziehungen zum psychischen Gedächtnis*, în *„Chemische Informationsspeicherung und Verarbeitung in biologischen Systemen"*, Angewandte Chemie, **76**, 720 (1964).
15. G. VALETTE, *Précis de Pharmacodynamie*, 2-ème édition, Masson et C^ie, Paris, 1964.
16. MEI CHEN-TUNG, *Deistvie korkovogo primenenia ribonucleasi na vissuiu nervnuiu deatelnosti u golubea*, Scientia Sinica, **13**, 524 (1964).
17. O. A. KRILOV, R. A. DANILOVA, V. S. TONGUR, *Vlianie ribonucleasi na bezuslovnie i uslovnie reflexi belth mişei v ontogeneze*, Jurnal vişşei nervnoi deiatelnosti, **15**, 79 (1965).

ST. CERC. BIOCHIM., 9, 3, 249–262 (1966)

CONTRIBUŢII LA STUDIUL BIOCHIMIEI REZISTENŢEI LA GER A CEREALELOR DE TOAMNĂ

IV. STUDIUL COMPARATIV AL CONŢINUTULUI ÎN ZAHĂR DIRECT REDUCĂTOR ŞI TOTAL LA CEREALELE DE TOAMNĂ, ÎN TIMPUL IERNII

I. BRAD

577.1:581.1

Rezumat. — În lucrare sînt prezentate rezultatele obţinute la determinarea conţinutului în zahăr direct reducător şi total în frunza şi nodul cu hipocotil la numeroase variante. Se calculează de asemenea raportul zahăr total/zahăr direct reducător. Se constată un conţinut mai mare de zaharuri în nodul cu hipocotil faţă de frunză, la toate variantele. Dintre specii, conţinutul cel mai mic îl are orzul; în frunză cel mai mare conţinut îl are secara, iar în nodul cu hipocotil grîul, foarte apropiat de secară. Dintre soiurile de grîu, conţinutul cel mai mare îl au cele foarte rezistente, iar cel mai mic soiurile foarte puţin rezistente. Dintre variantele agrotehnice, conţinutul cel mai mare se constată în nodul cu hipocotil al plantelor nutrite cu fosfor şi potasiu în cantitate mai mare. Conţinutul de zaharuri creşte de asemenea o dată cu scăderea temperaturii şi scade cu creşterea temperaturii şi a precipitaţiilor. Un conţinut mare de zaharuri apare ca o condiţie necesară, dar nu întotdeauna suficientă pentru realizarea unei rezistenţe maxime. Unele neconcordanţe între conţinutul de zaharuri şi rezistenţă sînt legate de insuficienţa metodei Hagedorn-Jensen, care trebuie asociată cu alte determinări. Alte neconcordanţe apar ca o consecinţă a unor diferenţe calitative legate de particularităţi metabolice şi biologice. Aceste aspecte sînt discutate.

În continuarea lucrărilor publicate anterior cu privire la relaţia dintre diferitele componente chimice, respectiv activităţi enzimatice din ţesuturile cerealelor de toamnă şi rezistenţa acestora la ger [8—10], în cele ce urmează vor fi prezentate date în legătură cu conţinutul de zahăr direct reducător şi total. Rezultatele expuse au fost obţinute într-un ansamblu de cercetări executate între 1958 şi 1962.

Conţinutului în glucide i s-a acordat o deosebită atenţie încă de la începutul cercetărilor referitoare la rezistenţa la ger. O părere predominantă în această problemă este aceea că glucidele au o mare importanţă în rezistenţa la ger şi că de concentraţia lor în sucul celular depinde protejarea proteinelor [1—7] [20] [22—24] [26—35] [37—40] [42—68]. Există însă şi date, obţinute de mulţi dintre aceiaşi autori, care scot în evidenţă un număr apreciabil de neconcordanţe între conţinutul în glucide simple sau complexe şi rezistenţa la ger. Multe dintre ele sînt subliniate

de Levitt [34] şi de Vasiliev [64], care formulează chiar concluzia că conţinutul de zaharuri constatat în toamnă nu poate caracteriza rezistenţa la ger a diferitelor soiuri de cereale. Între cercetările care adaugă o serie de constatări deosebite la cereale se situează acelea ale lui Belkin [4], care arată că un rol important are caracterul hidrolitic sau sintetic al invertazei. Avdonin [2] conchide că la grîul de toamnă crescut pe teren nisipos nu există o legătură strînsă între conţinutul în zahăr de la începutul iernii şi pieirea plantelor. Fedorova [13] afirmă că nu există o condiţionare strictă între rezistenţă şi conţinutul de zaharuri din nodurile de înfrăţire. Strelcenko [46] subliniază că o însămînţare tîrzie nu permite acumularea de zaharuri. Biglov şi Girfanov [7] arată o creştere a raportului zahăr/azot o dată cu creşterea rezistenţei, la variantele îngrăşate cu fosfor şi potasiu, mai ales cînd umiditatea solului este suficientă. Korovin [32] subliniază importanţa raportului dizaharide/monozaharide. Confirmînd unele cercetări ale lui Levitt, Tumanov şi Trunova [61] măresc rezistenţa unor cereale prin infiltrare de zaharuri simple. Efectul cel mai bun l-ar avea rafinoza, maltoza şi zaharoza. În ţara noastră, Chirilei şi Mavromati [20], Giosan, Buican şi Pîrvu [25], Valuţă [63], Brad şi Laszlo [18] [19], Milică [40] au constatat de asemenea o corelaţie pozitivă între rezistenţă şi conţinutul de zaharuri.

În cercetările noastre s-au luat în consideraţie un număr mare de variante, care includ un studiu comparativ între specii diferite (secară, grîu şi orz), soiuri diferite (36 de soiuri de grîu), organe diferite (nod cu hipocotil şi frunză), agrofond diferit şi ani cu regim hidric şi temperaturi diferite. Prin aceasta s-a contribuit la acumularea substanţială de informaţii referitoare la acest subiect, informaţii care, la data montării experienţelor, erau destul de restrînse în legătură cu cerealele de toamnă. Cercetări similare uneori, publicate după atacarea problemei de către noi, arată necesitatea abordării diferitelor aspecte luate în consideraţie.

Volumul nostru de lucrări, prin multitudinea variantelor, acoperă în ultimă instanţă totalitatea aspectelor ce trebuie luate în studiu comparativ, pentru a lămuri mersul conţinutului de zaharuri în funcţie de temperatură, umiditate şi, în cazul particular al cerealelor de toamnă, corelaţia între conţinutul de zaharuri şi rezistenţa la ger. Am urmărit astfel să stabilim dacă această corelaţie este categorică, dacă conţinutul în zaharuri constituie o condiţie necesară şi suficientă pentru explicarea fenomenului însuşi al rezistenţei, dacă metoda de analiză este în totală măsură răspunzătoare de rezultatele uneori ambigui, dacă în asociere cu alte determinări nu se poate optimiza interpretarea mecanismului rezistenţei şi criteriile de triere a plantelor. S-a urmărit de asemenea să se găsească o explicaţie a rezultatelor aparent contradictorii şi o perspectivă de lucru. Ţelurile generale ale lucrării au fost arătate în lucrările anterioare [8—10]. Pentru realizarea scopurilor de ansamblu, ca şi a celor legate de conţinutul de zaharuri, a fost necesară luarea în consideraţie a numărului mare de indici analizaţi simultan. Asociate, aceste determinări [8—18], executate concomitent, dau posibilitatea de a stabili corelaţii, de a interpreta şi de a formula concluzii sau prezumţii de perspectivă ce nu pot fi formulate de alte lucrări similare. În aceste lucrări similare se analizează un număr mai restrîns de variante, toate la un loc acoperind aspectele luate în consideraţie de noi.

MATERIAL ȘI METODE

În lucrările publicate anterior [8—10], s-au arătat amănunte cu privire la alegerea variantelor, condițiile de recoltare și de pregătire a probelor. Subliniem că soiurile de grîu au fost supuse și la temperaturi scăzute, la întuneric, pînă la —19° C. Temperatura inițială din frigider a fost egală cu cea din cîmp —5° C. Graficele cu precipitații și variații de temperatură au fost prezentate în prima lucrare a seriei [8].

Pentru dozarea zahărului s-a utilizat metoda Hagedorn-Jensen [21] [25].

S-au stabilit următoarele condiții de lucru : 0,2—0,4 g plantă uscată și pulverizată se introduc într-un balon cotat de 100 ml, se adaugă 70 ml apă distilată și se lasă la rece pînă a doua zi. Probele se agită din timp în timp. După extracție se adaugă 5 ml acid tricloracetic 10%. Se aduce volumul la 100 ml cu apă distilată și se filtrează prin filtru cutat. Din filtrat se pipetează într-o eprubetă 2—5 ml, se adaugă 1 ml acid clorhidric N/3 și apă distilată pînă la 7 ml. Eprubetele se fierb 30 min. După invertire se adaugă 1 ml soluție de carbonat de sodiu 5,3%. Pentru determinarea zahărului direct reducător nu se mai face invertirea cu acid clorhidric, ci se pun direct peste extract 2—5 ml fericianură de potasiu N/200 și apă distilată pînă la același volum. Probele pentru zahăr direct reducător și zahăr total se fierb în aceeași baie de apă timp de 30 min. După răcire se adaugă 2—3 picături de amidon în fiecare eprubetă, 2—5 ml acid acetic 30%, 2—5 ml amestec 4 : 1 de soluție de iodură de potasiu cu o soluție constituită din 100 g sulfat de zinc și 500 g clorură de sodiu, dizolvate și aduse la 1 600 ml. Iodul rezultat se titrează cu tiosulfat de sodiu n/200. Martorul este constituit dintr-o probă cu apă distilată în volum egal cu volumul de extract folosit. Conținutul de zahăr se calculează folosindu-se tabelele date pentru această metodă și ținîndu-se seama de cantitățile luate în lucru.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Analizînd comparativ conținutul de zahăr direct reducător și zahăr total din frunză, față de același conținut din nodul cu hipocotil (tabelele 1, 2, 3 și 4), se constată că în nodul cu hipocotil conținutul este mai mare decît în frunză, în marea majoritate a determinărilor executate la toate variantele. În legătură cu aceasta este bine să amintim că în nodul cu hipocotil, comparativ cu frunza, a fost găsită o activitate catalazică mai mică, un conținut de acid ascorbic mai mic și o activitate peroxidazică mai mare, cu excepția grîului. Din aceste rezultate se deduce că un conținut mai mare de zaharuri este favorabil rezistenței la ger, existînd o corelație pozitivă între rezistența la ger a organelor și conținutul lor în zahăr. Faptul că activitatea catalazică este mai mică în nodul cu hipocotil, pledează în același sens, lăsînd să se tragă concluzia că în nodul cu hipocotil sînt mai puțin intense procesele catabolice. Activitatea peroxidazică mai mare trădează un metabolism energetic mai economic [10] și în același timp valoarea mare a raportului zahăr total/zahăr direct reducător constatată la toate variantele la nodul cu hipocotil (tabelele 5, 6 și 7) poate fi interpretată ca fiind o consecință favorabilă provocată de inhibarea invertazei de către peroxidază [41]. Chiar și conținutul de acid ascorbic, mai redus față de frunză, poate fi considerat ca avînd un aspect favorabil, luînd în considerație numai efectul stimulator asupra activității catalazei.

Diferența între rezistența la ger a frunzelor și a nodului cu hipocotil este mai mare, din cîte știm, decît cea care se poate deduce luînd în consi-

Tabela 1

Variaţia conţinutului de zahăr direct reducător şi zahăr total, exprimat în g glucoză % s.u., în frunza şi nodul cu hipocotil de secară, grîu şi orz (1958–1961)

Data recoltării	Zahăr direct reducător						Zahăr reducător total					
	frunză			nod cu hipocotil			frunză			nod cu hipocotil		
	secară	grîu	orz	secară	grîu	orz	secară	grîu	orz	secară	grîu	orz
1.XII.58	1 190	1 100	1 140	1 105	1 295	1 100	3 085	2 820	2 675	3 200	3 475	3 165
9.XII.58	2 020	2 120	1 650	2 450	2 460	1 705	2 925	2 925	2 420	3 675	3 700	2 700
15.XII.58	1 615	1 390	1 120	1 635	1 520	1 300	3 150	2 785	2 420	3 235	3 405	2 935
18.XII.58	2 410	2 020	2 040	2 525	2 490	2 060	3 440	2 820	2 730	3 805	3 640	3 030
23.XII.58	1 210	1 350	1 210	1 650	1 820	1 655	3 060	2 740	1 990	3 649	2 905	2 755
3.I.59	1 345	1 055	1 055	1 400	1 530	1 255	2 525	2 205	1 880	2 885	3 110	2 970
9.I.59	1 880	1 925	1 925	1 880	2 060	1 925	2 655	2 340	2 170	2 920	2 845	2 740
23.I.59	2 050	1 500	1 430	2 060	2 255	2 050	2 675	2 250	1 975	2 920	3 255	2 890
28.I.59	1 500	1 310	1 105	1 215	1 275	1 350	3 130	2 900	2 490	3 040	3 385	3 005
16.II.59	1 985	1 460	1 055	1 425	1 715	1 800	3 315	2 500	1 850	3 350	3 325	3 250
4.III.59	1 500	1 055	955	1 085	1 033	985	2 605	2 685	2 410	2 520	2 285	1 975
19.III.59	725	510	440	540	440	520	1 750	1 065	1 170	1 625	1 265	1 410
21.III.59	1 850	820	865	1 140	875	1 000	1 775	1 065	1 255	1 645	1 430	1 480
23.III.59	805	575	475	625	400	505	2 125	1 205	1 055	1 895	1 185	1 690
8.IV.59	920	660	660	772	551	730	2 010	1 105	1 805	2 035	2 210	2 410
14.XII.59	1 215	1 140	920	1 510	1 880	1 310	1 895	1 470	1 070	2 640	2 615	2 070
28.XII.59	1 110	1 140	820	1 140	1 300	1 160	2 345	2 220	1 570	3 375	3 275	2 965
28.I.60	1 120	1 110	915	1 245	1 235	955	2 455	2 140	1 775	3 160	3 310	3 055
11.II.60	1 430	1 263	1 075	1 550	1 645	1 370	2 390	2 300	2 070	3 300	3 325	3 035
24.III.60	950	705	760	645	620	620	1 705	1 180	1 135	1 350	1 405	1 354
15.IV.60	1 085	820	1 075	785	635	680	2 210	1 540	1 570	1 480	1 400	1 760
20.XII.60	725	725	550	920	725	715	1 350	1 490	840	2 390	2 480	2 260
11.I.61	1 180	1 360	1 000	1 265	1 260	1 110	2 020	2 070	1 320	2 890	3 150	2 620
26.I.61	750	875	575	1 000	1 190	1 045	1 826	1 910	1 600	2 880	2 570	1 750
8.II.61	1 650	1 275	1 045	1 650	1 350	1 320	2 810	2 080	1 530	3 315	2 435	2 655
22.II.61	1 020	1 050	1 160	1 220	1 215	1 200	3 180	1 755	1 650	3 535	3 225	3 510
16.III.61	825	965	845	875	850	985	1 390	1 210	1 180	1 360	1 420	1 750
7.IV.61	585	575	565	475	585	585	1 120	1 205	1 160	1 775	1 645	1 010

Tabela 2

Variaţia conţinutului de zahăr direct reducător şi zahăr total, exprimat în g glucoză % s.u., în frunza de orz însămînţat pe teren neîngrăşat şi îngrăşat (NPK în diferite proporţii) (1958–1959)

Data recoltării	Zahăr reducător direct						Zahăr reducător total					
	NPK 000	NPK 111	NPK 311	NPK 131	NPK 113	NPK 333	NPK 000	NPK 111	NPK 311	NPK 131	NPK 113	NPK 333
9.XII.58	1 650	—	1 120	1 160	1 180	—	2 420	—	1 925	2 150	2 050	—
12.XII.58	1 015	—	1 095	1 075	1 030	—	2 090	—	2 180	2 265	2 375	—
22.XII.58	1 210	—	920	820	860	—	2 020	—	2 120	2 130	2 320	—
3.I.59	1 055	—	1 100	1 040	1 160	—	1 880	—	1 935	1 935	2 010	—
12.I.59	—	—	975	1 085	1 075	—	—	—	1 975	2 160	2 910	—
25.II.59	1 055	—	1 020	975	950	—	1 725	—	1 580	1 700	1 850	—
7.III.59	655	—	575	680	660	—	940	—	885	1 010	1 105	—
19.III.59	440	—	315	340	360	—	1 170	—	1 020	850	1 805	—
21.III.59	965	—	750	625	645	—	1 255	—	1 030	888	860	—
23.III.59	405	—	620	465	510	—	1 055	—	1 570	1 420	1 215	—
8.IV.59	680	—	795	690	750	—	1 805	—	1 740	1 350	1 715	—
14.XII.59	920	920	830	930	840	805	1 070	1 105	965	965	940	940
29.XII.59	820	940	810	880	830	830	1 570	1 790	1 450	1 590	1 605	1 520
28.I.60	910	840	910	815	840	920	1 775	1 550	1 655	1 580	1 490	1 250

Tabela 2 (continuare)

Data recoltării	Zahăr reducător direct						Zahăr reducător total					
	NPK 000	NPK 111	NPK 311	NPK 131	NPK 113	NPK 333	NPK 000	NPK 111	NPK 311	NPK 131	NPK 113	NPK 333
11.II.60	1 075	910	965	1 010	995	965	2 070	1 715	1 985	1 940	1 910	1 805
24.III.60	760	775	965	795	860	860	1 100	1 160	1 370	1 310	1 265	1 370
15.IV.60	1 075	875	725	820	830	910	1 570	1 510	1 275	1 450	1 410	1 645
20.XII.60	550	505	555	510	540	530	830	945	885	955	840	875
11.I.61	1 000	885	895	965	1 000	885	1 320	1 040	805	1 020	1 065	885
26.I.61	775	565	540	540	775	805	1 600	1 565	1 540	1 740	1 775	1 805
8.II.61	1 045	1 170	1 170	1 245	1 225	1 380	1 530	1 725	1 600	1 485	1 530	1 580
22.II.61	1 106	1 060	1 225	1 450	1 275	1 275	1 650	1 410	1 310	1 370	1 305	1 390
16.III.61	895	785	860	910	885	605	1 180	1 180	1 105	1 110	1 085	1 010
7.IV.61	565	610	585	660	605	475	1 560	1 570	1 150	1 350	1 520	1 085

Tabela 3

Variația conținutului de zahăr direct reducător și zahăr total, exprimat în g glucoză % s.u., în nodul de orz însămînțat pe teren neîngrășat și îngrășat (cu NPK în diferite proporții) (1958—1961)

Data recoltării	Zahăr reducător direct						Zahăr reducător total					
	NPK 000	NPK 111	NPK 311	NPK 131	NPK 113	NPK 333	NPK 000	NPK 111	NPK 311	NPK 131	NPK 113	NPK 333
9.XII.58	1 705	—	1 605	1 550	1 350	—	2 700	—	2 700	2 810	2 780	—
12.XII.58	1 205	—	1 225	1 310	1 030	—	3 105	—	3 115	3 335	3 335	—
22.XII.58	1 655	—	975	995	1 100	—	2 755	—	2 880	2 915	2 910	—
3.I.59	1 255	—	1 300	1 230	1 200	—	2 970	—	2 740	2 885	2 865	—
12.I.59	—	—	1 460	1 360	1 380	—	—	—	2 890	3 045	2 988	—
25.II.59	1 540	—	1 530	1 510	1 715	—	3 055	—	2 850	2 850	2 890	—
7.III.59	1 020	—	895	950	1 380	—	2 000	—	1 635	1 990	2 340	—
19.III.59	510	—	330	315	340	—	1 410	—	1 055	1 075	1 020	—
21.III.59	1 000	—	760	750	750	—	1 480	—	1 120	1 120	1 120	—
23.III.59	505	—	575	575	485	—	1 690	—	1 550	1 820	1 665	—
8.IV.59	730	—	750	975	865	—	2 410	—	2 440	2 470	2 750	—
14.XII.59	1 310	1 110	1 235	1 275	1 295	1 295	2 070	1 940	1 775	1 995	1 985	1 960
29.XII.59	1 160	1 330	1 370	1 150	1 150	1 030	2 265	3 095	2 865	2 975	2 925	2 900
28.I.60	955	1 130	1 180	1 085	1 140	1 245	3 055	3 070	2 930	3 200	2 945	2 945
11.II.60	1 370	1 370	1 390	1 340	1 570	1 430	3 035	2 890	3 035	3 020	3 035	970
24.III.60	620	695	725	655	620	680	1 330	1 625	1 645	1 940	1 900	1 500
15.IV.60	680	690	555	545	585	510	1 760	1 380	1 160	1 200	1 117	1 105
20.XII.60	715	715	705	930	985	1 020	1 460	1 625	1 507	1 895	1 805	1 890
11.II.61	1 100	1 105	1 075	1 215	1 360	1 170	2 620	2 540	2 340	2 700	2 845	2 570
26.I.61	1 045	820	1 040	1 440	1 655	1 405	1 750	1 835	1 750	1 835	1 975	2 150
8.II.61	1 320	1 320	1 410	1 410	1 460	1 410	2 655	2 685	2 590	2 845	3 075	2 445
22.II.61	1 200	1 420	1 670	1 885	1 740	1 210	3 210	3 355	3 150	2 855	2 855	2 755
16.III.61	985	635	805	530	785	625	1 750	1 775	1 410	1 460	1 430	1 255
7.IV.61	585	660	585	820	705	645	2 010	2 275	2 035	2 835	2 880	2 370

Tabela 4

Conținutul de zahăr direct reducător și zahăr total, exprimat în g glucoză s.u. în frunza și nodul cu hipocotil, la diferite soiuri de grîu după recoltare din cîmp și după supunere la —5 și la —19°C

Soiul	—5°C				—19°C			
	zahăr reducător direct		zahăr reducător total		zahăr reducător direct		zahăr reducător total	
	frunză	nod	frunză	nod	frunză	nod	frunză	nod
Lutescens 1060/10	19,80	22,36	28,18	32,70	19,85	30,65	26,55	39,90
Lutescens 329	18,13	18,93	29,30	36,50	20,95	20,00	29,10	—
Odessa 3	18,80	15,75	25,05	28,13	18,65	20,35	26,65	32,75
Hostianum 27	17,45	15,51	22,33	28,18	18,35	17,75	21,60	33,25
Minhardi	16,18	12,68	22,07	29,27	19,25	19,15	16,18	31,25
Skorospelka 3	16,43	16,41	27,72	24,30	16,85	19,85	22,66	26,40
Beloțerkovskaia 198	16,25	19,78	22,12	30,45	16,05	23,00	20,50	32,75
Mironovskaia 264	15,50	16,66	21,15	26,88	17,40	23,30	22,30	28,80
Bezostaia 1	18,52	15,91	23,33	30,45	18,20	22,20	21,85	35,60
804-B	13,43	11,38	14,43	16,80	12,05	15,80	14,60	24,30
Triumph	13,15	13,86	15,92	20,15	13,10	15,10	16,30	23,00
457-B	11,23	11,60	17,82	17,35	13,30	12,15	17,60	21,40
440-C	10,30	11,81	14,13	19,03	10,85	17,75	13,40	22,45
131-C	9,93	9,81	12,45	14,60	9,40	13,30	11,20	20,10
Bezostaia 4	14,38	16,38	22,46	30,70	15,18	18,65	22,95	31,25
Wichita	14,10	15,30	17,67	23,33	14,10	17,50	17,15	25,20
Bulgaria 301	13,32	9,30	19,57	21,45	14,30	12,55	18,20	22,75
Iași 645	11,80	10,25	17,55	15,85	14,10	15,10	17,05	21,70
Miciurinka	11,45	13,43	15,56	19,83	12,45	15,80	17,50	22,75
578-B	10,92	10,50	15,10	17,15	11,10	15,50	14,30	22,10
A-15	10,78	13,06	13,90	19,30	10,55	14,30	13,70	24,45
Ponca	10,73	10,55	15,50	18,01	12,45	14,10	15,80	20,80
Cenad 117	10,05	13,73	13,38	18,60	10,45	14,80	13,70	27,20
485-C	9,13	9,63	11,55	14,65	9,50	12,00	11,60	19,25
Kooperatorka	15,60	14,90	22,10	27,00	15,70	16,45	30,70	30,85
Studina 159	13,55	12,06	19,05	19,78	14,60	15,50	19,50	25,50
Harrach	13,11	13,20	14,07	21,86	19,36	15,80	14,35	28,35
Osetinskaia	11,23	13,11	14,75	17,68	11,40	16,45	17,50	22,20
Concho	10,43	12,78	12,55	15,30	12,00	14,20	18,05	22,85
Motinave	10,42	12,90	13,86	18,36	11,90	13,80	13,00	20,50
Odvos 241	8,50	8,65	11,23	12,00	8,30	11,40	11,80	13,50
Bankut 1201	7,77	10,15	11,55	15,38	8,50	10,30	11,50	19,85
520-B	7,40	8,45	9,92	12,30	8,40	10,10	11,60	18,95
405-B	7,00	6,18	12,60	8,80	7,70	9,20	9,75	12,25
San Pastore	8,60	7,11	11,42	12,13	8,20	9,40	11,40	12,00
Éto ile de Choisy	8,50	9,85	12,70	12,93	7,05	15,80	11,50	13,50

Tabela 5

Variația raportului dintre zahăr total și zahăr direct reducător în frunza și nodul cu hipocotil de secară, grîu și orz (1958—1961)

Data	frunză			nod cu hipocotil		
	secară	grîu	orz	secară	grîu	orz
1.XII.1958	2,59	2,56	2,34	2,89	2,68	2,87
9.XII.1958	1,44	1,38	1,40	1,51	1,51	1,59
15.XII.1958	1,95	2,00	2,16	1,98	2,24	2,25
18.XII.1958	1,42	1,30	1,25	1,50	1,46	1,48
23.XII.1958	2,53	2,03	1,64	2,21	1,59	1,66
3.I.1959	1,87	2,07	1,87	2,06	2,03	2,36

Tabela 5 (continuare)

Data	frunză			nod cu hipocotil		
	secară	grîu	orz	secară	grîu	orz
9.I.1959	1,41	1,21	1,29	1,55	1,57	1,56
23.I.1959	1,30	1,50	1,38	1,41	1,44	1,41
28.I.1959	2,86	2,21	2,25	2,50	2,65	2,44
16.II.1959	1,66	1,71	1,76	2,35	1,93	1,80
4.III.1959	1,73	2,54	2,52	2,32	2,21	2,00
14.XII.1959	1,55	1,28	1,16	1,75	1,39	1,58
28.XII.1959	2,11	1,95	1,91	2,96	2,52	2,55
28.I.1960	2,19	1,92	1,93	2,53	2,68	3,19
11.II.1960	1,69	1,82	1,92	1,48	2,02	2,21
24.III.1960	1,79	1,66	1,49	2,09	2,26	2,18
20.XII.1960	1,86	2,05	1,53	2,59	3,42	3,16
11.I.1961	1,71	1,52	1,32	2,28	2,50	2,36
26.I.1961	2,43	2,18	2,28	2,88	2,16	1,67
8.II.1961	1,70	1,63	1,46	2,01	1,82	2,01
22.II.1961	3,12	1,67	1,42	2,90	2,65	2,91
16.III.1961	1,68	1,25	1,39	1,55	1,67	1,76

Tabela 6

Variaţia raportului între conţinutul de zahăr total şi zahăr direct reducător în frunza şi nodul cu hipocotil de or însămînţat pe teren îngrăşat cu NPK în diferite proporţii

Data	frunză			nod cu hipocotil		
	$N_3P_1K_1$	$N_1P_3K_1$	$N_1P_1K_3$	$N_3P_1K_1$	$N_1P_3K_1$	$N_1P_1K_3$
9.XII.1958	1,72	1,85	1,73	2,68	1,81	2,05
12.XII.1958	1,99	2,10	2,30	2,54	2,53	3,23
22.XII.1958	2,30	2,60	2,70	2,95	2,93	2,64
3.I.1959	1,76	1,86	1,73	2,10	2,34	2,38
12.I.1959	2,03	1,99	2,70	1,98	2,24	2,16
25.II.1959	1,55	1,94	1,94	1,86	1,88	1,68
7.III.1959	1,54	1,48	1,67	1,82	2,09	1,69
19.III.1959	3,23	2,50	5,01	3,19	3,41	3,00
21.III.1959	1,38	1,42	1,33	1,47	1,49	1,49
23.III.1959	2,53	3,05	2,38	2,69	3,16	3,43
8.IV.1959	2,18	1,95	2,28	3,25	2,53	3,17
14.XII.1959	1,16	1,37	1,12	1,43	1,61	1,53
29.XII.1959	1,79	1,80	1,93	2,09	2,58	2,54
28.I.1960	1,81	1,93	1,77	2,48	2,94	2,58
11.II.1960	2,05	1,92	1,92	2,18	3,00	1,93
24.III.1960	1,42	1,77	1,47	2,26	2,96	3,06
15.IV.1960	1,75	1,76	1,70	2,09	2,20	1,91
20.XII.1960	1,59	1,87	1,55	2,13	2,30	1,83
11.I.1961	0,89	1,05	1,06	2,18	2,23	2,09
26.I.1961	2,85	3,22	2,29	1,68	1,27	1,19
8.II.1961	1,38	1,19	1,24	1,83	2,01	2,10
22.II.1961	1,07	0,94	1,02	1,80	1,51	1,64
16.III.1961	1,28	1,22	1,22	1,75	2,75	1,82
7.IV.1961	1,96	2,04	2,51	3,48	3,45	4,08

Tabela 7

Variația raportului între conținutul de zahăr total și zahăr direct reducător în frunza și nodul cu hipocotil, la diferite soiuri de grîu, după recoltare din cîmp și supunere la —5 și la —19°C

Soiul	—5°C		—19°C	
	frunză	nod	frunză	nod
Lutescens 1060/10	1,42	1,46	1,39	1,30
Lutescens 329	1,62	1,93	1,39	—
Odessa 3	1,33	1,85	1,48	1,60
Hostianum 239	1,28	1,81	1,17	1,87
Minhardi	1,36	2,31	0,84	1,62
Skorospelka 3	1,68	1,48	1,34	1,33
Beloţerkovskaia 198	1,36	1,53	1,27	1,42
Mironovskaia 264	1,36	1,62	1,28	1,23
Bezostaia 1	1,56	1,86	1,44	1,67
804-B	1,07	1,47	1,21	1,53
Triumph	1,21	1,45	1,24	1,52
457-B	1,67	1,49	1,32	1,76
440-C	1,37	1,61	1,23	1,26
131-C	1,25	1,48	1,19	1,51
Bezostaia 4	1,25	1,93	1,20	1,60
Wichita	1,25	1,52	1,21	1,45
Bulgaria 301	1,46	2,30	1,26	1,81
Iaşi 645	1,40	1,54	1,20	1,43
Miciurinka	1,35	1,47	1,40	1,44
578-B	1,38	1,63	1,29	1,42
A-15	1,48	1,54	1,20	1,71
Ponca	1,44	1,70	1,27	1,47
Cenad 117	1,33	1,36	1,31	1,16
485-C	1,26	1,52	1,22	1,66
Kooperatorka	1,41	1,81	1,95	1,87
Studina 159	1,40	1,64	1,28	1,64
Harrach	1,07	1,65	0,74	1,79
Osetinskaia	1,31	1,34	1,53	1,35
Concho	1,20	1,11	1,50	1,61
Motinave	1,33	1,42	1,09	1,48
Odvos 241	1,32	1,38	1,42	1,18
Bankut 1201	1,48	1,51	1,36	1,92
520-B	1,34	1,45	1,38	1,87
405-B	1,80	1,42	1,26	1,33
San Pastore	1,32	1,70	1,39	1,27
Etoile de Choisy	1,49	1,30	1,63	0,85

derație exclusiv conținutul de zahăr. Într-adevăr, la un conținut mai mare de zaharuri în nod, corespunde în marea majoritate a cazurilor un conținut mai mic de proteină [12] și, ca atare, capacitatea de protejare a zaharurilor crește și prin micșorarea conținutului de proteine. De asemenea și prezența altor substanțe în proporție diferită în nod față de frunză [12—17] condiționează rezistența la ger prin rolul lor particular în metabolismul intermediar. Aceste constatări ne atrag de la început atenția că nu trebuie să considerăm în mod obligatoriu că rezistența la ger este legată numai de un conținut mare de zaharuri sau de o valoare mare a raportului zahăr total/zahăr direct reducător.

Dacă se analizează tabela 1, care conține rezultatele comparative între secară, grîu și orz, se constată că după majoritatea valorilor conținutului de zahăr direct reducător sau de zahăr total din frunze, secara are conținutul cel mai mare, urmată de grîu, iar acesta de orz. După

cum vedem, ordonarea conținutului de zaharuri corespunde ordonării după rezistență. După valorile pentru aceleași substanțe din nodul cu hipocotil, orzul se situează tot pe ultimul loc. Valorile pentru zahărul direct reducător la nodul de înfrățire al grîului sînt însă de cele mai multe ori egale sau mai mari decît la secară în perioada de iarnă. Valorile pentru zahărul total la nodul de înfrățire al grîului sînt fie mai mari fie mai mici, de un număr egal de ori față de valorile constatate la nodul cu hipocotil de secară. Această constatare aduce primele elemente de neconcordanță între conținutul de zahăr și rezistența la ger.

Analizînd raportul între zahărul total și zahărul direct reducător la diferite specii, nu se ajunge la constatarea unei concordanțe clare (tabela 5). Se deduce din nou că un conținut mai mare de zaharuri favorizează rezistența, fără însă să excludă excepțiile. Este adevărat că fericianura de potasiu poate reacționa și cu alte substanțe decît zaharurile și ca atare ar fi de așteptat ca anumite neconcordanțe, constatate la nodul cu hipocotil, să fie corectate dacă se recurge și la alte metode [13]. Totuși, determinările cromatografice (de zaharuri) nu au schimbat concluziile și ordonarea constatată prin metoda Hagedorn-Jensen [13].

În consecință, pentru a explica totuși rezistența mai mare a secarei față de grîu, trebuie să ne gîndim la existența unui mecanism mai complex de protejare decît cel realizat prin simpla concentrare de zaharuri. Probabil că este vorba și de existența unor legături covalente între zaharuri și proteine [28] și că la secară cantități importante de zaharuri se găsesc combinate și sub o asemenea formă. Este posibil de asemenea ca proteinele din secară să aibă mai puține grupări vulnerabile decît proteinele din grîu. O distribuție mai bună a zaharurilor în celulă poate să constituie de asemenea un factor prin care se asigură o mai bună protejare și care nu poate fi prins nici prin metoda Hagedorn, nici prin metoda cromatografică.

Efectul nutriției minerale asupra conținutului de zaharuri este prezentat în tabelele 2 și 3. Analiza rezultatelor referitoare la conținutul de zahăr direct reducător din frunză nu duce la constatarea unei diferențieri în sensul favorizării acumulării zaharurilor cu ajutorul îngrășămintelor fosfatice și potasice. Numai conținutul de zahăr total din frunzele acestor ultime variante este cu puțin mai mare în lunile de iarnă ale celui mai geros an (1958—1959) și în lunile de primăvară (martie-aprilie) ale celor doi ani mai ploioși (1959—1961). Dacă se analizează tabela 3, se constată că conținutul de zahăr direct reducător din nod de asemenea nu este afectat de îngrășarea diferențiată, în sensul evidențierii vreunei variante privilegiate. Conținutul de zahăr total din nod se constată însă că este în marea majoritate a cazurilor mai mare la varianta cu trei doze de superfosfat sau sare potasică, față de varianta cu trei doze de azotat de amoniu. La această ultimă variantă și raportul zahăr total/zahăr direct reducător la nodul cu hipocotil este mai mic decît la celelalte în perioadele celor mai scăzute temperaturi (tabela 6). În rest, la variantele cu nutriție minerală diferențiată nu se constată vreo regularitate a acestui raport. Raportul proteine/zahăr total și analizele cromatografice de zaharuri [14] duc la constatarea unor diferențieri sistematice între aceste variante. Conținutul cel mai mare de zaharuri se constată la variantele cu îngrășăminte potasice și fosfatice în exces. În acest caz deci, metoda Hagedorn

a dat rezultate nesatisfăcătoare. Această concluzie însă nu impune excluderea ei ca metodă de investigaţie, ci numai asocierea ei cu alte metode.

Rezultatele prezentate în tabela 4, obţinute la analiza mai multor soiuri de grîu cu rezistenţă diferită la ger, conduc la constatarea că nu există o aranjare riguroasă a conţinutului de zahăr în raport cu rezistenţa la ger. Totuşi, se constată o grupare compactă, a soiurilor foarte rezistente pe primele cinci locuri. Soiurile cu rezistenţă mare sau mijlocie (Skorospelka 3—485 C) ocupă zona intermediară a clasamentului. Soiurile slabe (Kooperatorka — 405 B) şi foarte slabe (San Pastore şi Étoile de Choisy) se situează în zona conţinutului mic sau foarte mic de zaharuri. Este demn de observat că ordonarea după conţinutul din frunză diferă faţă de ordonarea după conţinutul din nod. De asemenea, se constată o altă ordonare dacă se ia în considerare zahărul total faţă de zahărul reducător direct sau conţinutul de la —5°C faţă de cel de la —19°C. Aceste rezultate conduc la aceleaşi concluzii formulate anterior, în legătură cu complexitatea acestei probleme. În particular, se constată că la unele soiuri mai puţin rezistente se găseşte o cantitate mai mare de zaharuri decît la un soi mai rezistent oarecare. Aceasta nu impune însă concluzia că un conţinut mare de zaharuri poate fi dăunător. Se poate deduce numai că un conţinut mare de zaharuri poate fi uneori puţin eficace într-un ansamblu fiziologic şi metabolic defectuos. Din analiza tabelei 7, referitor la raportul zahăr total/zahăr direct reducător, nu se poate trage concluzia existenţei unei corelaţii între valoarea acestui raport şi rezistenţa la ger, indiferent de organul considerat sau de temperatura de expunere. La orice temperatură însă, acest raport este mai mare la nod decît la frunză.

Luînd în consideraţie rezultatele tuturor tabelelor şi urmărind mersul conţinutului de zaharuri în funcţie de temperatură şi de precipitaţii, se constată creşterea acestui conţinut o dată cu scăderea temperaturii, respectiv scăderea conţinutului o dată cu creşterea temperaturii, fără nici o excepţie. Reamintesc faptul că iarna anului 1958—1959 a fost cea mai geroasă, temperatura medie crescînd în ceilalţi doi ani o dată cu precipitaţiile. Conţinutul de zaharuri se constată că suferă o scădere a valorilor medii o dată cu îmblînzirea climei şi creşterea cantităţii de precipitaţii.

Totalitatea cercetărilor confirmă rolul şi importanţa zaharurilor în protejarea contra acţiunii dăunătoare a gerului. Zaharurile se acumulează de cele mai multe ori în cantităţi mai mari în organul mai rezistent, la soiul mai rezistent, la specia mai rezistentă, la varianta agrotehnică cu îngrăşăminte în care predomină fosforul şi potasiul. Se acumulează în cantităţi mai mari la scăderea temperaturii şi în anii cu temperaturile medii mai scăzute şi precipitaţii mai puţin abundente. În pofida acestor constatări, o seamă de excepţii arată că acumularea de zaharuri este o condiţie necesară, dar nu întotdeauna suficientă.

În legătură cu metoda folosită, unele cercetări ale noastre arată că este necesară o asociere a determinărilor de zaharuri după Hagedorn, cu determinări după alte procedee. Pentru înlăturarea unor neconcordanţe între conţinutul de zaharuri şi rezistenţă este obligatorie luarea în consideraţie şi a altor indici. Alte neconcordanţe apar ca o consecinţă a unor particularităţi metabolice necunoscute de noi şi care depăşesc în consecinţă posibilităţile prezente de înţelegere.

CONCLUZII

1. Conținutul de zahăr direct reducător și zahăr total, determinat prin metoda Hagedorn-Jensen este mai mare în nodul cu hipocotil decît în frunză, în marea majoritate a cazurilor, fapt care corespunde ordonării organelor după rezistență.

2. În frunză conținutul de zahăr direct reducător și total descrește în ordinea secară, grîu, orz, ceea ce corespunde ordonării acestor specii după rezistența lor la ger. În nodul cu hipocotil, zahărul direct reducător descrește în ordinea grîu, secară, orz, iar zahărul total este practic egal la secară și grîu și cel mai mic la orz.

3. Conținutul de zahăr direct reducător determinat prin metoda Hagedorn-Jensen nu permite constatarea unor diferențieri între frunzele plantelor de orz îngrășate diferențiat cu azot, fosfor și potasiu. O diferență clară se constată numai în ceea ce privește conținutul de zahăr total din nod, la plantele nutrite cu mai mult fosfor și potasiu fiind mai mare.

4. Conținutul de zahăr reducător direct și zahăr total este mai mare la soiurile de grîu mai rezistente și este mai mic la soiurile mai puțin rezistente. Această corelație are și excepții.

5. Conținutul de zahăr direct reducător și total crește o dată cu scăderea temperaturii și scade o dată cu creșterea temperaturii în timpul iernii. De asemenea, valorile medii se micșorează o dată cu îndulcirea climei anilor și creșterea volumului de precipitații.

6. Raportul zahăr total/zahăr direct reducător este mai mare numai la nodul cu hipocotil față de frunză și la nodul cu hipocotil de orz îngrășat cu mai mult fosfor și potasiu față de varianta cu îngrășăminte azotate mai multe, în perioada celor mai scăzute temperaturi. Nu se constată nici o regularitate în restul cazurilor.

7. Conținutul de zaharuri constituie un indice important, dar nu categoric pentru trierea plantelor și pentru înțelegerea rezistenței la ger. Apare necesară asocierea determinării zaharurilor prin metoda Hagedorn, cu alte metode, inclusiv metoda cromatografică.

8. Lipsa unei concordanțe depline între conținutul de zaharuri și rezistența la ger este uneori legată de deficiențe ale metodei Hagedorn. În alte cazuri, lipsa unei corelații se datorește unor particularități fiziologice și metabolice ale plantelor.

9. Determinarea conținutului de glucoproteide, distribuția zahărului în celule, raportul între diferitele zaharuri, asocierea diferitelor rezultate obținute la determinarea zaharurilor cu alte determinări, inclusiv conținutul de proteine, constituie o perspectivă de lucru pentru o corectă triere a plantelor și o justă înțelegere a mecanismului rezistenței.

Prezentat la redacție la 29 decembrie 1965

Secția de fiziologie și biochimie vegetală agricolă, I.C.C.P.T. Fundulea — București

BIBLIOGRAFIE

1. Apelt A., *Neue Untersuchungen über den Kältetod der Kartoffel*, Beiträge zur Biologie der Pflanzen, 1907, Band 9,215.
2. Avdonin N. S., *Ustoicivosti ozimîh kultur k neblagopriatnîm usloviam perezimovki na dernovo-podzolistîh pocivah necernozemnoi polosi*, Zimost. Selskohoz. Kult., Moskva, 1960, 58.
3. Belkin N. I., *Zimostoikosti rastenii*, Kişinev, Izd. Ştiinţa, 1961.
4. Belkin N. I., *Fermentativnie pokazateli zimostoikosti rastenii*, Fiz. Ust. Rast., Moskva, 1960, 107.
5. Belkin N. I., *Contribuţii la caracterizarea biochimică a rezistenţei la frig a grîului de toamnă*, Rev. ref. chimie I.R.S., 1957, 7.
6. Belkin N. I., *Biohimiceskie pokazateli zimostoikosti i sposobî borbî s gibeliu zimuiuşcih rastenii*, Zimost. selskohoz. kultur, Moskva, 1960, 15.
7. Biglov T. T., Girfanov V. K., *Vlianie mineralnogo pitania na zimostoikosti i produktivnosti ozimoi pşenifi na serîh lesnîh pocivah başkirskogo preduralia*, Fiz. Ust. Rast., Moskva, 1960, 49.
8. Brad I., *Contribuţii la studiul biochimiei rezistenţei la ger a cerealelor de toamnă. Nota I. Studiul comparativ al conţinutului în vitamină C la cereale de toamnă, în timpul iernii*, St. cerc. biochim., **8**, 163 (1965).
9. Brad I., *Nota II. Studiul comparativ al activităţii catalazei la cerealele de toamnă, în timpul iernii*, St. cerc. biochim., **8**, 293 (1965).
10. Brad I., *Nota III. Studiul comparativ al activităţii peroxidazei la cereale de toamnă, în timpul iernii*, St. cerc. biochim., **9**, 11 (1966).
11. Brad I., Sotiriu V., Steroiu V., *Nota V. Studiul comparativ al activităţii dehidrazelor şi respiraţiei la cereale de toamnă în timpul iernii. Unele diferenţieri legate de potenţialul redox* (în curs de publicare).
12. Brad I., *Nota VI. Studiul comparativ al conţinutului de proteină brută la cereale de toamnă în timpul iernii* (în curs de publicare).
13. Brad I., *Nota VII. Diferenţieri ale conţinutului de zahăr, aminoacizi şi substanţe aromatice evidenţiate cromatografic la cereale de toamnă* (în curs de publicare).
14. Brad I., *Nota VIII. Studiul comparativ al aciditătii totale titrabile la cereale de toamnă în timpul iernii* (în curs de publicare).
15. Brad I., *Nota IX. Studiul comparativ al conţinutului de cenuşe, fosfor şi potasiu la cereale de toamnă în timpul iernii* (lucrare nepublicată).
16. Brad I., *Nota X. Studiul comparativ al conţinutului de apă, substanţă uscată şi al capacităţii de reţinere a apei la cereale de toamnă în timpul iernii* (lucrare nepublicată).
17. Brad I., *Nota XI. Studiul comparativ al metabolismelor intermediare la cereale de toamnă, cu rezistenţe diferite la ger, în timpul iernii. Reprezentare grafică* (lucrare nepublicată).
18. Brad I., Laszló Iulia, Valuţă Gh., Miclea Clementa, *Influenţa transplantării embrionului de orz pe endospermul de secară asupra unor procese biochimice la hibrizi, în corelaţie cu rezistenţa la ger*, St. cerc. biochim., **5**, 551 (1962).
19. Brad I., Laszló Iulia, Valuţă G., *Studii fiziologice şi biochimice asupra comportării unor soiuri de orz în condiţii de iernare*, Analele I.C.A.R., **XXVII**, seria C, 35 (1959).
20. Chirilei H., Mavromati E., *Contribuţii la studiul rezistenţei la ger a cerealelor de toamnă*, Lucrările sesiunii ştiinţifice, Inst. Agronomic „N. Bălcescu", Bucureşti, 1955, vol. 1, 133.
21. Ermakov A. I., *Metodî biohimiceskogo issledovania rastenii*, Selhozgiz, Leningrad, 1952, 164.
22. Fedorova N. A., *Priemî povişeniia zimostoikosti i urojainosti ozimoi pşenifi v polesie i lesostepi Ukraini*, Zimost. Selskohoz. Kultur, 1960, 114.
23. Gassner G., Grimme C., *Beiträge zur Frage der Frosthärte der Getreidepflanzen*, Ber. deut. botan. Gaz., **31**, 507 (1913).
24. Giosan N. şi colab., *Contribuţii la studiul rezistenţei la ger a unor soiuri de grîu de toamnă în vederea raionării lor*, St. cerc. agronomie (Cluj), **X**, 49 (1959).
25. Hagedorn-Jensen, *Die Ferricyamidmethoden zur Blutzuckerbestimmung*, Biochem. Ztsch., **137**, 92 (1923).
26. Heber U., *Beziehungen zwischen der Grösse von Chloroplasten und ihrem Gehalt an löslichen Eiweissen und Zuckern im Zusammenhang mit dem Frostresistenzproblem*, Protoplasma, **51**, 2, 284 (1959).

27. Heber U., *Ursache der Frostresistenz bei Winterweizen. I. Die Bedeutung der Zücker für die Frostresistenz*, Planta, **52**, 4, 431 (1958).
28. Hodges H. F., *Characterisation of proteins and carbohydrates associated with cold hardening in winter wheat* (*Triticum aestivum*), Dissert. Abstr., **25**, 738 (1964).
29. Jung G. A., Smith D., *Influence of extended storage at constant low temperature on cold resistance and carbohydrate reserves of alfalfa and medium red clover*, Plant Physiol., **35**, 123 (1960).
30. Iuhimciuk F. F., *Fiziologhiceskie osnovi zimostoikosti klevera*, Zimost. selskohoz. kultur, Moskva, 1960, 183.
31. Konovalov N. I., Lerman I. R., Mihaleva N. E., Smetannikova A. I., Silova N. V., *Pitmi rosta i morozostoikosti drevesnih rastenii*, Fiz. Ust. Rast., Moskva, 1960, 198.
32. Korovin A. I., Barskaia T. A., Noviţkaia I. E., *Nekotorie osobennosti perezimovki ozimih kultur i mnogoletnih trav na severe*, Fiz. Ust. Rast., Moskva, 1960, 54.
33. Krujilin A. S., *Nakaplenie saharov u ozimih „Avirceh" i iarovih pşeniţ pri ponijannih temperaturah*, Fiz. rast., **3**, 374 (1963).
34. Levitt J., *The hardiness of plants*, Academic Press, New York, 1956.
35. Makaro I. L., Kondrateva A. V., *Vlianie zakalki semian pomidorov peremennimi temperaturami na vinoslivosti rastenii k holodu i urojai plodov*, Fiz. Ust. Rast., Moskva, 1960, 193.
36. Mason H. S., *Mechanism of oxigen metabolism*, Adv. enzimol., **19**, 70 (1957).
37. Maşkin S. I., *O putiah aklimatizaţii i povişenia zimostoikosti cereşin*, Fiz. Ust. Rast., Moskva, 1960, 319.
38. Maximov N. A., *Zimostoikosti rastenii. Izbrannie rabotî po zasuhoustoicivosti i zimostoikosti rastenii*, vol. II, Izd-vo Akademii Nauk SSSR, Moskva, 1952.
39. Mininberg S. I., *Morozostoikost i osobennosti obmena veşcestv vinograda pri razlicinih usloviah pitania*, Fiz. Ust. Rast., Moskva, 1960, 327.
40. Milică C. I., Pîrjol Liana, Jungu Ana-Maria, Brad I., Hurduc N., *Cercetări fiziologice şi biochimice asupra rezistenţei la ger a unor soiuri de grîu de toamnă*, Analele I.C.C.P.T., **31**, Seria C. 18 (1964).
41. Mirback K., *Invertases*, în *The Enzymes*, Academic Press, New York, 1960, vol. 4, 379.
42. Moscov Iv., Nicov M., Bozova L., *Issledovanie svobodnih aminokislot i saharov v pocikah vinogradnoi lozi vo vremia vegetaţii i pokoia*, Dokl. Akad. Nauk, **150**, *6*, 1389 (1963).
43. Ogoleveţ I. V., *Dinamika prevraşcenia uglevodov v holodnoe vremia goda v kore drevesnih porod v sviazi s ih morozostoikostiu*, Fiz. Ust. Rast., Moskva, 1960, 234.
44. Okunţov M. M., Aksenova F. O., *Osobennosti povedenia dihatelnoi sistemî pri zakalivanii rastenii*, Fiz. Ust. Rast., Moskva, 1960, 113.
45. Parker J., *Relationships among cold hardiness water soluble protein, antocyanins and free sugars in Hedera helix L.*, Plant physiol., **37**, 809 (1962).
46. Petrucioli G., Amicucci A., *Primo contributo allo studio dei raportti tra il contenuto di umidita e di zuccheri delle foglio dell'olivo e la rezistenza al freddo*, Ann. Sper. Agr., **6**, 975 (1960).
47. Pîiklik K. M., *Nakoplenie i rashodovanie saharov v sveazi s perezimovkoi ozimih*, Fiz. rast., **10**, 2, 130 (1963).
48. Polişciuk L. K., *Zavisimosti zimostoikosti greţkogo oreha ot pogodnih uslovii goda*, Fiz. Ust. Rast., Moskva, 1960, 366.
49. Proţenko D. F., Bogomaz E. I., *Ob osobennostiah obmena veşcestv u razlicinih po morozostoikosti plodovih kultur*, Fiz. Ust. Rast., Moskva, 1960, 241.
50. Puhalski V. A., Ukalov A. A., *Zavisimosti zimostoikosti ozimih tviordih pşeniţ ot nakoplenia saharov v osennii period*, Vestnik s.-h. nauki, 3, 113 (1965).
51. Romanovskaia O. I., *Fiziologo-biohimiceskie osobennosti razlicinih po zimostoikosti ghibridov cereşni*, Fiz. Ust. Rast., Moskva, 1960, 288.
52. Ruelcks C. O., Smith D., *Overwintering trends of cold resistance and carbohydrates in medium red, ladino and common white clover*, Plant. Physiol., **31**, 364 (1956).
53. Saakian R. G., *Fiziologo-biohimiceskie osobennosti vinogradnoi lozi v sviazi s eë morozostoikostiu*, Fiz. Ust. Rast., Moskva, 1960, 331.
54. Sergheev L. I., *Fiziologo-biohimiceskie osobennosti zimostoikih i nezimostoikih dreveanih rastenii*, Fiz. Ust. Rast., Moskva, 1960, 251.
55. Strelcenko T. I., *Zimostoikosti ozimogo iacimenia na Bukovine*, Zimost. selskohoz. kult., Moskva, 1960, 127.
56. Suleimanov I. G., *Nekotorie biohimiceskie izmenenia, vliaiuşcie na vodoobmen i morozoustoicivosti klevera krasnogo*, Fiz. Ust. Rast., Moskva, 1960, 140.
57. Tavadze P. G., *Vlianie agropriemov na ustoicivosti vinogradnoi lozi protiv zimnih nizkih temperatur*, Fiz. Ust. Rast., Moskva, 1960, 336.

58. Trunova I. T., *Vlianie veşcestv razlicinoi himiceskoi prirodi na morozostoikost koleoptilei ozimoi rji viatka*, Fiz. Ust. Rast., Moskva, 1960, 117.
59. Tumanov I. I., *Fiziologhiceskie osnovi zimostoikosti rastenii*, Moskva, Selhozghiz, 1940.
60. Tumanov I. I., Borodina I. N., *Untersuchungen über die Kälteresistenz von Winterkulturen durch direkter Gefrieren und indirekte Methoden*, Phytopathol. Ztschr., **I**, *6*, 575 (1930).
61. Tumanov I. I., Trunova T. I., *Pervaia faza zakalivaniia k morozu ozimîh rastenii v temnote na rastvorah saharov*, Fiz. rast., **10**, 2, 176 (1963).
62. Ulrich R., *Cold and plant metabolism*, Bull. Soc. Franc. Physiol. Veg., **7**, 144 şi 54 (1961).
63. Valuţă G., Brad I., Laszlo Iulia, *Schimbări fiziologice şi biochimice la orzul de toamnă în condiţiile de iernare ale anului 1956—1957*, St. cerc. biochim., **2**, 147 (1959).
64. Vasiliev I. M., *Zimovka rastenii*, Izd. Akad. Nauk SSSR, Moskva, 1956.
65. Vakulini A. A., Ustenko G. P., *Nekotorîe dannie po fiziologii morozostoikosti plodovîh i lesnîh rastenii v Stalingradskoi oblasti*, Fiz. Ust. Rast., Moskva, 1960, 261.
66. * * *, *Zimostoikost selskohoziaistvennîh kultur. Materiali naucinoi konferenţii po voprosam zimostoikosti ozimîh zernovîh kultur i mnogoletnîh trav*, 14—17. I. 1958 *g.*, Izd. Min. Selsk. Hoz. SSSR, Moskva, 1960.
67. Zaiţeva M. G., *Dîhanie i mineralnoe pitanie rastenii*, Fiz. rast., **12**, 794 (1965).
68. Zeeh A. C., Pauli A. W., *Cold resistance in three varieties of winter wheat as related to nitrogen fractions and total sugar*, Agron. J., **52**, 334 (1960).

ST. CERC. BIOCHIM., 9, 3, 263–268 (1966)

EXOSMOZA SODIULUI, POTASIULUI ŞI CALCIULUI DIN PIELEA UMANĂ ÎN DIFERITE STĂRI PATOLOGICE

MIOARA CĂRSTEANU

616.5 : 541. 1

Rezumat. — S-a urmărit exosmoza sodiului, potasiului şi calciului din pielea umană, în următoarele boli: dermatoze acute cu exsudaţie importantă, dermatoze alergice cronice, dermatoze alergice cu inflamaţie în derm, lupus eritematos acut şi cronic. S-a constatat că valorile exosmozei sodiului, potasiului şi calciului depăşesc în majoritatea cazurilor limita superioară a valorilor exosmozei acestor ioni din pielea umană normală. Diferenţa dintre valorile medii corespunzătoare acestor cationi în cazurile normale şi valorile medii corespunzătoare în bolile de piele studiate, raportată la abaterea standard a acestei diferenţe, este distinct semnificativă în majoritatea cazurilor.

Pielea, ca orice ţesut, îşi are caracteristicile sale care îi imprimă un anumit specific. Totodată însă, aceste caracteristici sînt legate de reactivitatea întregului organism, de metabolismul lui în general. Fenomenele care au loc la nivelul pielii trebuie deci privite ca un tot unitar, atît din punct de vedere al specificului său, cît şi ca răspuns al activităţii metabolice generale. De aceea, cercetarea în bolile de piele presupune precizarea caracteristicilor rezultate între mecanismele generale ale bolii şi cele tisulare [1].

Categoriile mari de boli nu trebuie definite numai după mecanismul lor patogenic. Elementul fundamental al sistematizării este însăşi unitatea ce rezultă din desfăşurarea unui fenomen morbid în condiţiile biochimice specifice unui ţesut. Se poate astfel urmări desfăşurarea reacţiilor biochimice de la alterarea iniţială a mecanismului biochimic local, apărută sub influenţa agentului nociv, şi pînă la modificările ce interesează întreg organismul. În acest sens, pielea fiind ţesutul ce vine în contact cu cea mai mare parte din agenţii străini, prezintă un interes deosebit [2].

Aportul biochimiei s-a limitat multă vreme la o trecere în revistă a constituenţilor mai mult sau mai puţin caracteristici ai pielii şi a variaţiei lor în decursul diferitelor boli de piele. Materialul documentar în această privinţă este însă foarte variat, dispersat şi de cele mai multe ori contradictoriu [3] [4].

Am considerat de aceea că urmărirea procesului de exosmoză a unor cationi în diferite boli de piele ar putea fi utilă pentru obţinerea unor indicaţii cu privire la modificarea biochimică apărută sub acţiunea agentului patogen.

Într-o lucrare anterioară [5], am urmărit variaţia exosmozei sodiului, potasiului şi calciului din pielea umană normală în funcţie de sex.

În lucrarea de față cercetăm exosmoza cationilor menționați, din pielea umană, în diferite boli ale ei, *in situ*.

Am ales acești cationi, deoarece ei prezintă importanță în activitatea funcțională celulară. Astfel, rolul principal al ionului de sodiu în lichidul extracelular constă în menținerea echilibrului acido-bazic; datorită proprietăților sale hidrofile, el intervine în metabolismul apei, determinînd umflarea coloizilor tisulari. Potasiul intervine, probabil, în metabolismul glucidic, prin capacitatea sa de neutralizare. Calciul participă la stabilirea echilibrului hidric, precum și, sub formă de coferment, la unele procese enzimatice [6].

Literatura de specialitate menționează modificări ale echilibrului sodiului, potasiului și calciului din pielea umană în decursul unor maladii nespecifice, cum ar fi tuberculoza pulmonară, afecțiunile renale, afecțiunile cardiace, mixedemul, hipertiroidismul etc. [7]. De asemenea, în urma iradierii cu raze ultraviolete conținutul în calciu al epidermului și părții superioare a corionului crește în regiunile iradiate [8]. La bolnavi de psoriazis s-a observat o creștere a conținutului de calciu în stratul cornos, față de pielea umană normală. În schimb, la bolnavii de nevrodermită, conținutul de calciu al epidermului este considerabil micșorat [9], [10].

Bolile de piele în care s-a urmărit exosmoza sodiului, potasiului și calciului au fost împărțite în patru mari grupe, după caracteristicile lor clinice, și anume :

1. Dermatoze acute, cu exsudație importantă, dintre care am urmărit : dermite de contact, eczeme, intertrigo, dishidroze.
2. Dermatoze alergice cronice : prurigo și nevrodermite.
3. Dermatoze alergice cu inflamație în derm : alergodermia și urticaria.
4. Lupus eritematos, cu cele două forme : acut și cronic.

Metoda folosită a fost cea descrisă în lucrări anterioare, permițînd cercetarea unor aspecte ale biochimismului pielii în condiții de structură intactă a materialului biologic viu [11] [12]. Ea prevede utilizarea unui cristalizor Jena cu diametrul de 4,5 cm și o capacitate de 15 ml, care se umple pînă la marginea de sus cu apă distilată, la temperatura camerei, și se aplică pe suprafața pielii. O dată realizat contactul între tegument și apa distilată din cristalizor, începe exosmoza electroliților din piele, care durează 15 minute ; apoi cristalizorul se îndepărtează. În soluție se determină sodiul, potasiul și calciul cu ajutorul unui fotometru de flacără Carl Zeiss Jena, tip III, la o presiune de acetilenă de 40 ml apă, o presiune a aerului comprimat de 0,3 atm, o deschidere a diafragmei de 35 și o sensibilitate a galvanometrului de 1 x. Rezultatele sînt exprimate în mg substanță la 100 ml soluție.

Determinările au fost făcute la o temperatură de 21—22° C pe antebraț, porțiunea ventrală.

În condițiile menționate, s-au efectuat 117 determinări în 76 cazuri, dintre care : 44 dermatoze acute cu exsudație importantă (24 bărbați și 20 femei), 5 cazuri de dermatoze alergice cronice (2 bărbați, 3 femei), 22 cazuri de dermatoze alergice cu inflamație în derm (9 bărbați și 13 femei), 8 cazuri de lupus eritematos acut la femei și 7 de lupus eritematos cronic la femei.

Din datele obținute în lucrarea anterioară [1] a rezultat că valorile exosmozei sodiului, potasiului și calciului din pielea umană normală variază în funcție de sex, în condițiile date, între anumite limite, așa cum reiese din tabelele 1, 2 și 3.

În lucrarea de față se constată că, în bolile de piele menționate mai sus, valorile exosmozei sodiului, potasiului și calciului depășesc, în majoritatea cazurilor, limita superioară a valorilor exosmozei acestor ioni din pielea umană normală.

Din 57 de determinări făcute în cazuri de dermatoze acute cu exsudație importantă, au prezentat o exosmoză cu valori cuprinse în limite normale sau chiar subnormale 9 determinări în ceea ce privește sodiul, și 14 determinări în ceea ce privește potasiul și calciul.

Din cele 13 determinări în cazuri de dermatoze alergice cronice, una singură prezintă valori ale exosmozei sodiului, potasiului și calciului în limite normale.

30 de determinări făcute în cazuri de dermatoze alergice cu infiltrații în derm au condus, în urma exosmozei, la valori cuprinse în limite normale în 4 cazuri pentru sodiu, în 9 cazuri pentru potasiu și în 14 cazuri pentru calciu.

În lupusul eritematos acut, din 10 determinări într-un singur caz s-au găsit valori ale exosmozei sodiului și potasiului cuprinse în limite normale și în 6 cazuri în ceea ce privește exosmoza de calciu. În lupusul eritematos cronic, din 7 determinări una singură indică o exosmoză de potasiu în limite normale și 4 o exosmoză de calciu în limite normale.

Așa cum reiese din cele arătate, precum și din tabelele 1, 2 și 3, cationul sodiu pare să fie cel mai ușor cedat, *in situ*, de pielea pusă în contact cu apa distilată. Urmează potasiul, iar calciul este cel mai stabil dintre cationii menționați, fapt care se reflectă pe de o parte în limitele sale restrînse de variații în cazurile de exosmoză pe pielea unui organism sănătos, iar pe de altă parte în faptul că și în cazurile patologice, în care variațiile de exosmoză depășesc aceste limite, valorile obținute sînt totuși foarte apropiate. Acest fapt ar părea firesc prin aceea că ionul de sodiu este un cation extracelular, potasiul un cation intracelular, iar calciul un cation bivalent, mai greu difuzibil. Totuși, fenomenul menționat are loc atît în cazurile în care determinările au fost făcute pe leziune, deci cînd celulele nu mai prezintă o integritate morfologică, iar alterarea membranei aduce după sine eliberarea conținutului celular, precum și în unele cazuri în care determinările au fost făcute la aceiași bolnavi, pe porțiuni simetrice de piele aparent sănătoasă (date nepublicate). Fenomenul ar putea fi totuși datorat faptului că, așa cum se constată din literatură de specialitate, în pielea umană (în epiderm și derm luate în totalitate) sodiul se găsește în cantitatea cea mai mare ; urmează potasiul, apoi calciul [13].

Paralel cu determinările de sodiu, potasiu și calciu din pielea umană în diferite stări patologice, s-au făcut și determinări de conductibilitate a soluțiilor rezultate în urma exosmozei. S-a constatat că o creștere a exosmozei peste limitele normale a cel puțin unuia din cationii studiați aici este însoțită de creșterea conductibilității soluției peste limitele normale ; în cazurile în care sodiul, potasiul și calciul exosmozează în limitele normale, conductibilitatea soluțiilor respective se situează între aceste limite stabilite în funcție de sex în lucrări anterioare [12] [13]. Acest fapt ne face să credem că în condițiile menționate, în timpul exosmozei nu trec din piele în soluție, în cantități sesizabile, alți ioni în afară de cei amintiți.

Din calculele noastre rezultă că diferența dintre valorile medii corespunzătoare exosmozei acestor cationi în cazurile normale ($\bar{x}_1$) și

Tabela 1

Exosmoza sodiului (mg %) din pielea umană în cazuri normale şi patologice

Felul cazurilor	Nr. determinări	Limita inferioară	Limita superioară	Media aritmetică	Varianţa s^2	Abaterea standard *Sd*	$\frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{Sd}$	P
Bărbaţi :								
Normal	12	0,090	0,140	0,105				
Dermatoze alergice cu inflamaţie în derm	15	0,110	0,606	0,274	0,015	0,047	3,59	<0,01
Dermatoze alergice cronice	6	0,130	0,300	0,250	0,002	0,022	6,59	<0,01
Dermatoze acute cu exsudaţie importantă	29	0,057	0,887	0,354	0,049	0,075	3,32	<0,01
Femei :								
Normal	14	0,020	0,070	0,035				
Dermatoze alergice cu inflamaţie în derm	15	0,025	0,466	0,146	0,007	0,030	3,70	<0,01
Dermatoze alergice cronice	7	0,055	0,425	0,188	0,007	0,039	3,92	<0,01
Dermatoze acute cu exsudaţie importantă	28	0,050	0,520	0,169	0,009	0,030	4,46	<0,01
Lupus eritematos acut	10	0,029	0,465	0,202	0,007	0,035	4,77	<0,01
Lupus eritematos cronic	7	0,087	0,630	0,198	0,011	0,048	3,39	<0,01

Tabela 2

Exosmoza potasiului (mg %) din pielea umană în cazuri normale şi patologice

Felul cazurilor	Nr. determinări	Limita inferioară	Limita superioară	Media aritmetică	Varianţa s^2	Abaterea standard *Sd*	$\frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{Sd}$	P
Bărbaţi :								
Normal	12	0,170	0,290	0,214				
Dermatoze alergice cu inflamaţie în derm	14	0,075	0,845	0,281	0,049	0,087	0,77	=0,4—0,5
Dermatoze alergice cronice	6	0,070	0,410	0,280	0,042	0,102	0,64	=0,5—0,6
Dermatoze acute cu exsudaţie impor-- tantă	25	0,025	1,000	0,308	0,058	0,084	1,12	=0,2—0,3

Femei :								
Normal	14	0,000	0,000	0,000				
Dermatoze alergice cu inflamație în derm	15	0,000	0,085	0,032	0,0003	0,006	5,33	<0,01
Dermatoze alergice cronice	7	0,000	0,200	0,083	0,002	0,020	4,15	<0,01
Dermatoze acute cu exsudație importantă	27	0,000	0,475	0,109	0,009	0,031	3,52	<0,01
Lupus eritematos acut	10	0,000	0,254	0,095	0,003	0,022	4,32	<0,01
Lupus eritematos cronic	7	0,000	0,765	0,256	0,025	0,073	3,51	<0,01

Tabela 3

Exosmoza calciului (mg %) din pielea umană în cazuri normale și patologice

Felul cazurilor	Nr. determinări	Limita inferioară	Limita superioară	Media aritmetică	Varianța s^2	Abaterea standard *Sd*	$\frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{Sd}$	P
Bărbați :								
Normal	12	0,070	0,090	0,077				
Dermatoze alergice cu inflamație în derm	15	0,040	0,200	0,090	0,0007	0,010	1,3	<0,01
Dermatoze alergice cronice	6	0,055	0,340	0,229	0,005	0,035	4,3	<0,01
Dermatoze acute cu exsudație importantă	29	0,020	0,350	0,137	0,003	0,017	3,5	<0,01
Femei :								
Normal	14	0,050	0,060	0,055				
Dermatoze alergice cu inflamație în derm	14	0,015	0,150	0,056	0,020	0,053	0,018	>0,9
Dermatoze alergice cronice	7	0,015	0,150	0,114	0,0002	0,006	9,8	<0,01
Dermatoze acute cu exsudație importantă	27	0,030	0,190	0,090	0,001	0,010	3,5	<0,01
Lupus eritematos acut	10	0,000	0,254	0,054	0,002	0,017	0,058	>0,9
Lupus eritematos cronic	7	0,000	0,140	0,059	0,0003	0,008	0,5	=0,6—0,7

valorile medii corespunzătoare cazurilor de exosmoză a sodiului, potasiului și calciului în bolile de piele studiate ($\bar{x}_2$), raportată la abaterea standard *Sd* a acestei diferențe, este distinct semnificativă, probabilitatea de transgresiune fiind sub 1% (*P* este mai mic de 0,01). Fac excepție cazurile de exosmoză a potasiului în dermatozele acute cu exsudație importantă, dermatozele alergice cronice și dermatozele alergice cu inflamații în derm la bărbați, unde probabilitatea de transgresiune P este egal cu 0,4—0,5 în primul caz, cu 0,5—0,6 în al doilea caz și cu 0,2—0,3 în ultimul caz. De asemenea, fac excepție cazurile de exosmoză a calciului în dermatozele alergice cu inflamații în derm, la femei, în care P este mai mare de 0,9 și în lupusul eritematos acut și cronic, la femei, în care P depășește 0,9 și respectiv este egal cu 0,6—0,7.

Datele obținute în această lucrare fac posibile noi cercetări în ceea ce privește corelația între exosmoza acestor cationi din piele în diferite stări patologice și unele tratamente cu acțiuni multiple asupra metabolismului, ca de exemplu corticoterapia; s-ar putea aduce astfel contribuții în legătură cu dozarea tratamentului nu numai în funcție de specificul bolii, dar și în funcție de specificul organismului respectiv. De asemenea, cercetări viitoare vor încerca să stabilească posibilitatea de punere în evidență cu acest test a predispoziției unui organism la unele dermatoze, cum ar fi dermitele de contact, fapt care ar reprezenta un aport la igiena muncii, acolo unde muncitorii vin în contact cu unele substanțe nocive.

Aducem și pe această cale mulțumiri cu prisosință doctorului Radu Dumitriu, șef de secție la Centrul dermato-venerologic Colentina, precum și întregului colectiv de sub conducerea acad. prof. dr. Ștefan Gh. Nicolau, care ne-a pus la dispoziție bolnavii și tot materialul clinic ajutător pentru această lucrare.

Prezentat la redacție la 3 februarie 1966

Institutul de biochimie al Academiei Republicii Socialiste România

BIBLIOGRAFIE

1. V. Mihăilescu, *Introducere în biochimia bolilor de piele*, Ed. Academiei R.P.R., 1956.
2. M. Florkin, *Lésions biochimiques*, Exp. ann. biochim. méd., **VIII**, 97 (1948).
3. L. Eichelberger, M. Roma, *Electrolyte and nitrogen distribution in whole fat free skin and heat — separated corium and epidermis*, J. Invest. Dermat., **12**, 125 (1949).
4. W. Suntzeff, C. Carruthers, *The mineral composition of human epidermis*, J. Biol. Chem., **160**, 567 (1945).
5. M. Cârsteanu, *Exosmoza sodiului, potasiului și calciului din pielea umană normală*, St. cerc. biochim., **8**, 177 (1965).
6. J. Kimmig, R. Wehrmann, *Biochemie der Haut*, Dermat. u. Venerologie (H. A. Gottron, H. H. W. Schönfeld), **I**, *2*, 1178 (1962).
7. G. F. Rubino, L. Pettinati, G. Gerato, G. Martino, *Cutaneous sodium and potassium in various morbid conditions*, Minerva Med., **49**, 3148 (1958).
8. O. Gans, *Zur Histo-Topochemie der gesunden und kranken Haut*, Arch. Dermat. (Berlin), **161**, 67 (1930).
9. M. F. Engman, Mc Cardle R. C., *Histochemical study of neurodermatitis; preliminary report: microincineration and spectrographic analysis*, Arch. Dermat. (Chicago), **42**, 109 (1940) citat după (6).
10. R. C. Mc Cardle, C. M. F. Jr. Engman, M. F. Sr. Engman, Arch. Dermat. Chicago 47, 335 (1943), citat după [6] p. 1186.
11. E. Macovschi, S. Comoroșan, *Cercetări conductometrice asupra exosmozei electroliților din piele*, St. cercet. chimie, *4*, 271 (1956).
12. E. Macovschi, S. Comoroșan, *Konduktometrische Untersuchungen der Elektrolytexosmose aus der Haut*, Arzt. Forschung., **12**, 2 (1958).
13. St. M. D. Rothman, *Physiology and Biochemistry of the Skin*, 1955, p. 505.

ST. CERC. BIOCHIM., 9, 3, 269–276 (1966)

CENZURA PROTEINOCLAZICĂ ÎN ABSORBȚIA DE PROTEINE ȘI POLIPEPTIDE DIN INTESTIN *

N. ȘT. CHIȘIU

612.398 : 612.38

Rezumat. — Numeroase date din literatură arată că tractul digestiv al nou-născutului la mai multe specii de mamifere — inclusiv om — lasă — în primele ore sau în primele zile după naștere, nu și mai tîrziu — să treacă în circulația sanguină proteine colostrale. Totuși, alergiile alimentare arată că și intestinul matur poate absorbi molecule antigenice, cel puțin în unele condiții. Autorul presupune că transferul în circulația sanguină a moleculelor antigenice din intestin este controlat numai de enzimele proteolitice digestive, respectiv că fenomenul e dependent de o cenzură proteoclazică. Verifică acest concept administrînd, pe cale digestivă la iepuri și șobolani, diferite proteine eteroloage, contînd pe o acțiune antitriptică a albușului de ou crud și pe o componentă proteică din serul sanguin și din colostrul proaspăt. Utilizînd seruri imune corespunzătoare, pune în evidență absorbția din intestin la iepure și șobolani a unor proteine din albuș de ou, gălbenuș de ou, ser sanguin de găină și ser sanguin și colostru uman. Unele dintre acestea se elimină în urină și în bilă. Metoda imunoelectroforetică și a dublei difuziuni în agar arată că proteinele absorbite n-au fost modificate din punct de vedere antigenic și electroforetic.

Pentru a demonstra că și aspectele funcționale ale moleculelor absorbite rămîn nemodificate, autorul administrează — tot pe cale digestivă (intragastric sau intraduodenal) — insulină la iepuri normali și la șobolani normali ori diabetizați prin alloxan și obține curbe de hipoglicemie corespunzătoare. Aceasta arată că molecula de insulină — în condițiile experimentului — a fost absorbită din intestin și transferată în circulația sanguină fără modificarea caracteristicilor sale hormonale, respectiv a structurii funcționale.

Se comentează aspectele medicale practice ale acestor date.

Deși alergiile alimentare — fenomen care presupune absorbția din intestin a unor molecule ce-și păstrează nemodificate cel puțin unele din grupările antigenice — sînt destul de frecvente [6], datele de fiziologie privind absorbția proteinelor rețin în special transferul în circulația sanguină a aminoacizilor [11].

Ținînd seama de aspectele medicale ale problemei și de eventuale soluții practice, pe de o parte privind eficiența digestiei, alergiile alimentare și alte complicații patologice posibile, iar pe de altă parte vizînd posibilitatea administrării *per orale* a unor hormoni ca insulina, ne-am propus să cercetăm, în raport cu activitatea enzimelor proteolitice, absorbția din intestin, la iepuri și șobolani tineri și maturi, a unor proteine

* O parte din materialul cuprins în această lucrare constituie o contribuție la studiul insulinoterapiei per orale (cf. conv. nr. 4374/1965, Biofarm, dos. nr. 736).

eteroloage. În acest sens, Ardri şi Courtin [2] au arătat că inhibînd proteoliza pancreatică, intestinul de iepure matur absoarbe gamma-globulinele de cal. Pe de altă parte, în cercetări anterioare, noi am constatat că unele fracţiuni proteice ale serului sanguin uman ori componente proteice din albuşul de ou de găină, administrate intravenos la iepure şi la şobolan alb, se elimină nemodificate din punctul de vedere al reacţiei de antigenicitate, parte prin urină, parte prin bilă [1].

Utilizînd în special testul eliminării urinare a unor proteine eteroloage din organism, am căutat să vedem dacă intestinul de animal matur (iepure şi şobolan) este capabil să transfere molecule proteice „întregi"*** din alimente în circulaţia sanguină de unde să fie apoi eliminate pe cale renală.

Pe de altă parte, utilizînd un polipeptid cu funcţie hormonală uşor controlabilă (insulina cu acţiunea ei hipoglicemiantă), am căutat să verificăm dacă prin absorbţie intestinală nu se modifică aspectul funcţional al moleculei.

METODĂ

Am utilizat ca antigene complexe proteine de albuş şi proteine din gălbenuş de ou de găină, ser sanguin şi colostru uman şi ser sanguin de găină, în intubare sau consumare liberă la iepure şi şobolani albi. Pentru detectarea în circulaţia sanguină şi în urină a proteinelor absorbite de intestin, am folosit metoda dublei difuzii în agar Ouchterlony, imunoelectroforeza după Grabar, cu modificări după Osserman [41], sau tehnici personale de identificare a unui antigen [2]

Pentru obţinerea precipitatului imun specific am utilizat seruri imune antialbuş de ou de găină, antigălbenuş de ou de găină sau ser precipitant antiser sanguin de găină, toate preparate de noi pe iepure, după tehnici comunicate anterior [9], şi de asemenea ser imun de cal antiser de om, preparat la Institutul Cantacuzino.

Pentru controlul absorbţiei polipeptidelor am utilizat insulina cristalină Biofarm, iar pentru dozarea glicemiei metoda Hagedorn-Jensen.

În cercetare am utilizat 65 de şobolani Wistar (de ambele sexe, 110—120 g), 11 iepuri Chinchilla argintii (între 2000 şi 2500 g) şi 16 pui de iepure (Chinchilla) nou-născuţi.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

După administrarea serului sanguin de găină cu o pipetă-biberon la 6 pui de iepure sugari în vîrstă de o zi, am putut pune în evidenţă absorbţia din intestin în sînge, a două componente proteice ale serului sanguin de găină, şi anume a serum-albuminei şi gamma-globulinei (γG) (fig. 1, godeu 1).

Prin acelaşi procedeu nu s-a realizat o absorbţie a proteinelor din albuşul de ou de găină la alţi 4 pui de iepure de o zi.

După alimentarea similară a altor 6 pui de iepure, în vîrstă de pînă la 12 ore, cu ser sanguin de găină sau cu gălbenuş de ou de găină, au fost găsite de asemenea în circulaţia sanguină fracţiuni proteice ale acestora,

[1] Cercetări personale nepublicate (1964).
Determinanţii antigenici rămîn prezenţi în totalitate sau în cea mai mare parte.
[2] Aceste tehnici sînt în curs de apariţie în volumul despre imunoelectroforeză (V. Gheţie şi I. Micuşan, Edit. Academiei Republicii Socialiste România, 1966).

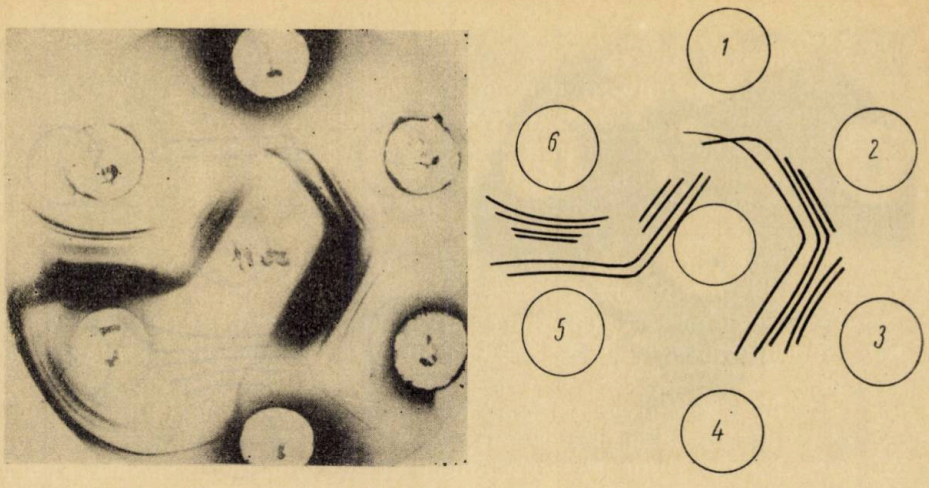


Fig. 1. — Absorbţia din tubul digestiv la puiul de iepure nou-născut a unor proteine eterologe :

1 — ser sanguin de la pui de iepure după alimentare cu ser sanguin de găină prin pipeta-biberon; *2* — supernatant după centrifugarea conţinutului gastric la acelaşi; *3* — mixtură de albuş de ou de găină cu ser sanguin de găină; *4* — ser sanguin de la pui de iepure intubat intragastric cu albuş de ou de găină; *5* — ser imun de iepure antialbuş de ou de găină; *6* — conţinut gastric de la puiul de iepure cu serul în *4*. În godeul central, ser imun de iepure antiser sanguin de găină.

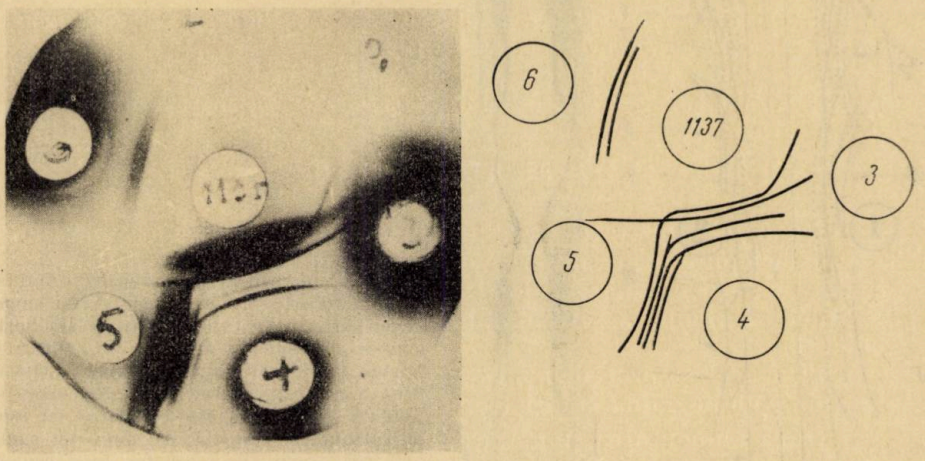
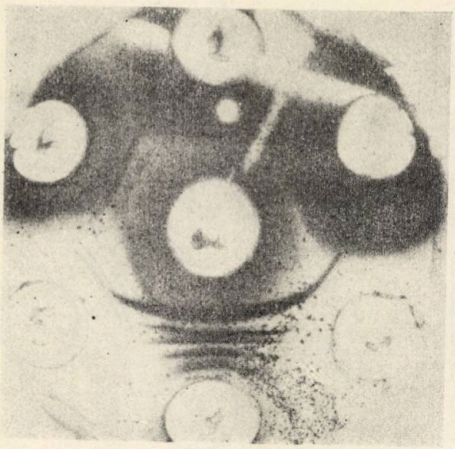


Fig. 2. — Pui de iepure nou-născut alimentat cu pipetă biberon : absorbţia din tubul digestiv a proteinelor din gălbenuş de ou de găină şi a celor din ser sanguin de găină.

3 = ser sanguin de la pui de iepure după alimentare cu gălbenuş de ou de găină sau cu ser sanguin de găină (*6*); *4* = ser sanguin de găină în amestec cu gălbenuş de ou; *5* = ser imun de iepure antiser sanguin de găină. Central = ser imun de iepure antigălbenuş de ou de găină.



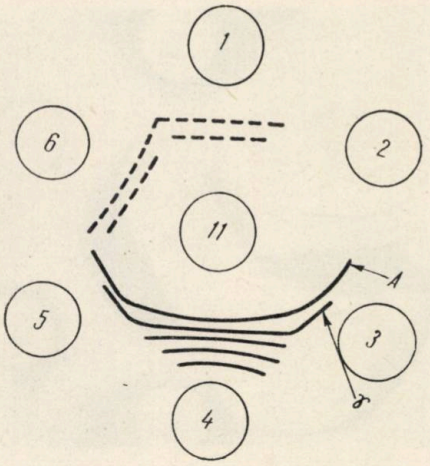


Fig. 3. — Absorbția din tubul digestiv și eliminarea urinară la șobolanul alb matur a unor proteine din colostrul de femeie după consumarea liberă a acestuia;

3 = probă de urină de la 5 șobolani colectată timp de 24 de ore; *5* = *idem* dar de la alt lot de șobolani. *1* = ser sanguin de la unul din acești șobolani: *6* = ser sanguin de la un șobolan martor. Central = ser imun de cal antiser sanguin de om.

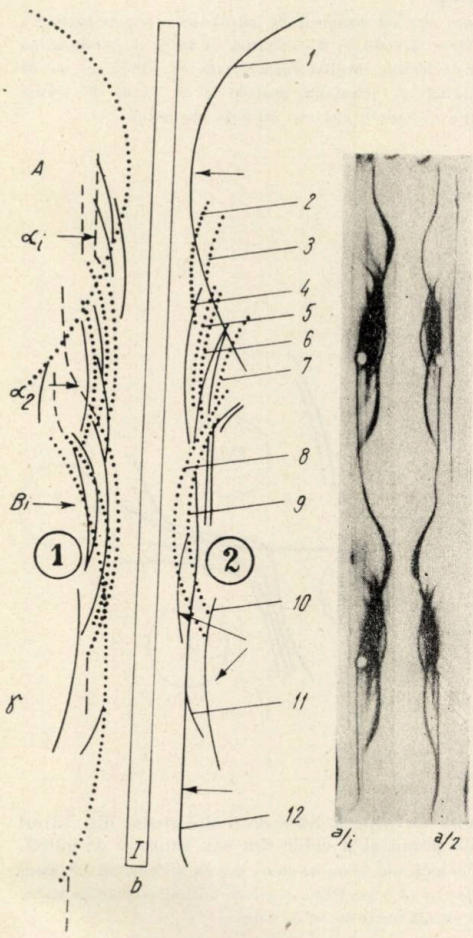
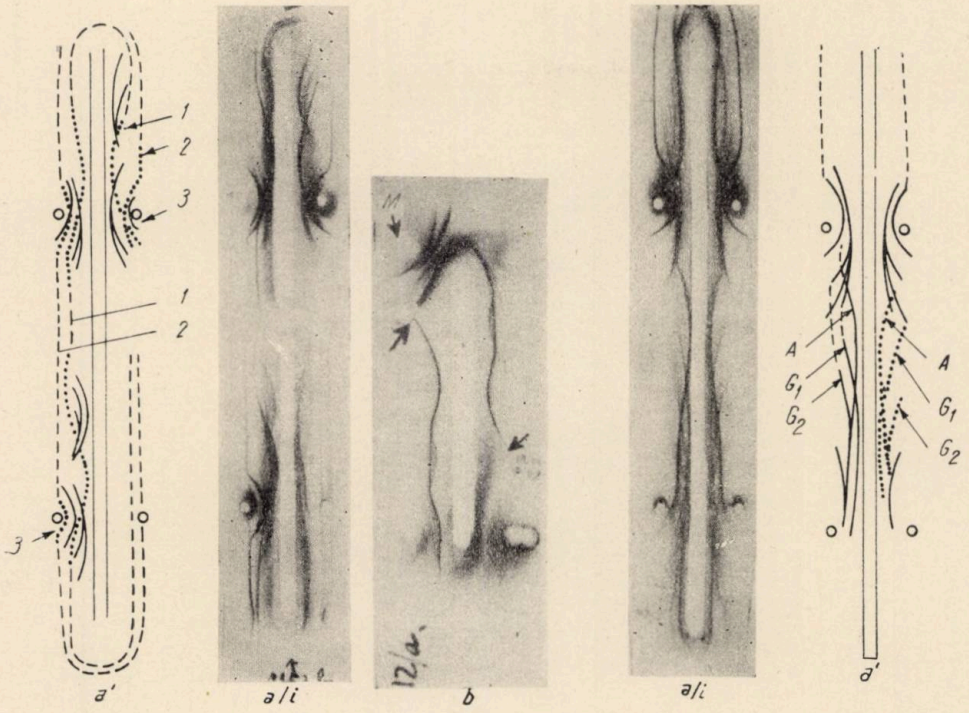


Fig. 4. — Identificarea imunoelectroforetică (prin metoda Osserman completată) în sîngele venei porte (*a/1*) și în urină (*a/2*) la șobolani a unor componente proteice din colostru de femeie la 60 min după intubarea intragastrică a acestora. În cele patru godeuri = ser sanguin uman; în șanțul central = ser imun de cal antiser sanguin de om; în șanțul *a/1* = ser sanguin de la șobolan după intubare cu colostru; în *a/2* = urină de la aceiași șobolani *b* = diagramă imunoelectroforetică de ser sanguin uman; linii punctate = componente proteice a căror absorbție din tractul digestiv a fost pusă în evidență pe criteriul specificității electroforetice și antigenice.



5 A 5 B

Fig. 5. — Absorbția din tubul digestiv de șobolan matur a unor proteine din gălbenuș de ou de găină (*A*) și din albuș de ou de găină (*B*).
Imunoelectroforeza după Osserman (completată) și diagrama sa. În godeurile de sus și stînga jos (5/A) = gălbenuș de ou de găină ; în godeul de jos-dreapta = albuș de ou de găină ; în șanțul central = ser imun de iepure antigălbenuș de ou de găină. În șanțurile laterale = urină de șobolani maturi, după intubare gastrică cu gălbenuș ; liniile punctate în diagramă = proteinele din gălbenuș prezente în urina șobolanilor (aceste proteine nu se găsesc și în albușul de ou). *b* = mai multe mostre de urină de șobolani supuse dublei difuziuni contra ser imun antigălbenuș de ou ; săgețile indică lipsa de reacție a urinei de la șobolani martori normali. *M* = gălbenuș de ou. 7/B — în godeurile de sus = gălbenuș de ou de găină ; în cele de jos — albuș de ou de găină ; în șanțul central ser imun de iepure antialbuș de ou de găină. În șanțul lateral din stînga = urină de la șobolani intubați cu albuș de ou de găină. Linii punctate — proteine absorbite din tubul digestiv și eliminate trans-renal nemodificate antigenic.

care deci au fost absorbite de intestin fără vreo modificare a structurii lor antigenice, cum se vede în figura 2.

Evident că aceste date arată doar că în perioada neonatală tractul digestiv poate absorbi intacte și proteine eterologe. În această perioadă, absorbția proteinelor omologe — în special a imunoglobulinelor colostrale—este bine stabilită, prin cercetări făcute la vițel [42] [38] [35] [31] [20] [32], la miel [32], la șobolan [10] [5] [3] [24] [23] [22], la șoarece [10] și la om [18], deși în ultimul caz nu totdeauna confirmate [37]. Această cale oferă la mamalieni posibilitatea imunizării pasive [36], căci glanda mamară excretă preferențial, în colostru, gamma-globulină [13], iar intestinul absoarbe fără selecție[44] (inclusiv proteine antigenice, putîndu-se induce pe această cale, și la această vîrstă, o toleranță imunitară) [15].

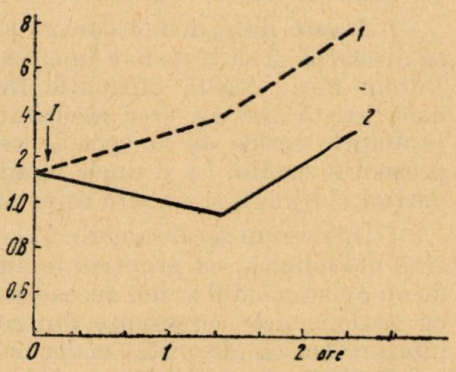


Fig. 6. — 24u.i. insulină, amestecată în prealabil cu 15 ml albuș de ou de găină crud, intubată în stomac la iepure matur și apoi alimentare normală. *2*= curbă indicînd scăderea glicemiei la acesta în comparație cu un martor (*1*).

Absorbția de proteine intacte din intestin ar trebui să aibă loc însă și mai tîrziu, probabil în dereglări ale activităților de digestie și absorbție, dacă încercăm să interpretăm chiar și numai apariția alergiilor alimentare [21] [6], care sînt destul de frecvente [49].

Puține studii au reținut aceste aspecte, atenția cercetătorilor fiind concentrată asupra aminoacizilor, atunci cînd s-a urmărit eficiența absorbției unor proteine. Citățm în acest sens unele studii făcute pe om, pisică și șobolan [12] [54] [11].

Noi am urmărit la iepure și șobolan adult absorbția din intestin a proteinelor cu molecula intactă, căci pentru cele eterologe credem că nu poate fi pusă problema resintezei după absorbție.

Ilustrăm succint datele obținute la 20 de șobolani maturi de 110—120 g, urmăriți în loturi de cîte 5. Aceștia au fost hrăniți liber — după post de 24 ore — cu ser sanguin uman și cu colostru.În urina colectată pînă a doua zi am putut pune în evidență, constant, prezența serum-albuminei și a gamma-globulinelor, așa cum arată figura 3 și mai ales cum precizează imunoelectroforeza din figura 4 a/2.

Controlînd la alți 10 șobolani prezența în serul sanguin a proteinelor colostrale intubate cu sonda în stomac, am constatat după 60 min, în sîngele venei porte (recoltat prin sacrificarea animalelor), prezența, pe lîngă serum-albumină și gamma-globuline, a trei constituenți din zona $alfa_2$-globulinelor și trei din zona $beta_1$-globulinelor. În zona α_2-globulinelor apărea constant componenta $alfa_{2M}$, uneori ceruloplasmina și o componentă neidentificată. În zona $beta_1$-globulinelor se găsea constant siderofilina, uneori $beta_1$-lipoproteina și o componentă proteică neidentificată, dar apropiat corelată cu lipoproteina respectivă. Aceste date sînt ilustrate în figura 4.

Administrînd cu sonda în stomac albuş de ou de găină crud la 5 iepuri, am obţinut rezultate similare cu cele de mai sus, adică s-a realizat o absorbţie din intestin a unor proteine eterologe, nemodificate din punct de vedere antigenic, inclusiv excreţia unora dintre acestea în urină.

Încercările pe care le-am făcut cu proteine de albuş de ou de găină sau din gălbenuş de ou de găină, administrate cu sonda în stomac la 15 şobolani, după aceeaşi schemă ca mai sus, au confirmat concluziile. S-au identificat astfel constant, în urină, la şobolani, două proteine de tip globulinic din gălbenuşul de ou (fig. 5 *A*), ovalbumina şi două globuline din albuşul de ou (fig. 5 *B*).

Aceste date demonstrează suficient că şi intestinul matur este apt să absoarbă şi să transfere în circulaţia sanguină molecule proteice întregi. Putem face această afirmaţie fiindcă am verificat în studii prealabile dacă există sau nu vreo identitate antigenică, parţială sau totală, între proteinele serice de la speciile cercetate şi cele introduse în intestin în prezentul studiu, ca şi unele relaţii între specii pe acest criteriu [8], date parţial sprijinite şi pe alte cercetări [45] [26].

Întrucît în serul sanguin [7] şi în colostru [46] se găseşte componenta alfa$_1$-globulinică, cu proprietate antitriptică, şi pe de altă parte în albuşul de ou ovomucoidul avînd aceeaşi proprietate [19] [34], asimilate funcţional cu antienzimele cunoscute din soia [30] şi linte [17], am fi tentaţi să interpretăm că absorbţia moleculelor proteice intacte la nivelul intestinului depinde de activitatea enzimelor proteolitice — în bună măsură de tripsină — fenomenul fiind deci supus cenzurei proteinoclazice. De altfel, în cazurile de sensibilitate la gliadină s-a pus în evidenţă o insuficienţă specifică în enzime proteolitice [52], care evident pot fi în suferinţă şi în alte situaţii clinice, ca în fibroza chistică a pancreasului [39] şi, foarte des, în denutriţia proteică [50], căci această carenţă este repede resimţită la nivelul tractului digestiv, unde timpul de înlocuire al proteinelor este foarte scurt, deci metabolismul acestora foarte activ (B.S. Platt, citat de [17]). În astfel de situaţii clinice credem că este de subliniat pericolul nu numai al sensibilizării la alimente (alergie alimentară), dar poate mai mult chiar cel al unor complicaţii autoimune, în cazurile în care s-ar absorbi, cu o frecvenţă corespunzătoare, proteine străine, dar avînd corespondenţe antigenice cu organismul respectiv. Am reţine în acest sens unele componente biliare [9] şi poate complexul colagenic, dar acesta din urmă n-a fost studiat în acest sens.

Această interpretare ne îndreaptă atenţia către enzimele proteolitice din tractul digestiv, care prin activitatea lor normală contribuie nu numai la nutriţie (o componentă importantă a sănătăţii), dar şi la împiedicarea pătrunderii în organism a unor substanţe dăunătoare, antigenice.

Absorbţia proteinelor din intestin — atunci cînd activitatea enzimatică o permite — nu modifică nici funcţiile lor. Cînd am administrat *per oral* insulină cristalină (în amestec cu albuş de ou crud) la 6 iepuri şi 20 de şobolani, ea a fost absorbită din tractul digestiv, la aceste specii de animale (una erbivoră, alta omnivoră), cu funcţia sa hormonală nemodificată căci de fiecare dată am înregistrat, consecutiv acestei administrări, o scădere a glicemiei.

Aceste date sînt ilustrate în figura 6 pentru iepurele matur, și în figura 7 pentru șobolani maturi normali, în faza de absorbție postprandială, iar în figura 8 pentru șobolani diabetizați în prealabil prin alloxan.

După administrarea insulinei cu sonda în stomac sau cu acul de seringă direct în duoden, după laparatomie, randamentul activității hormonale era apropiat de cel constatat în cazul administrării subcutane :

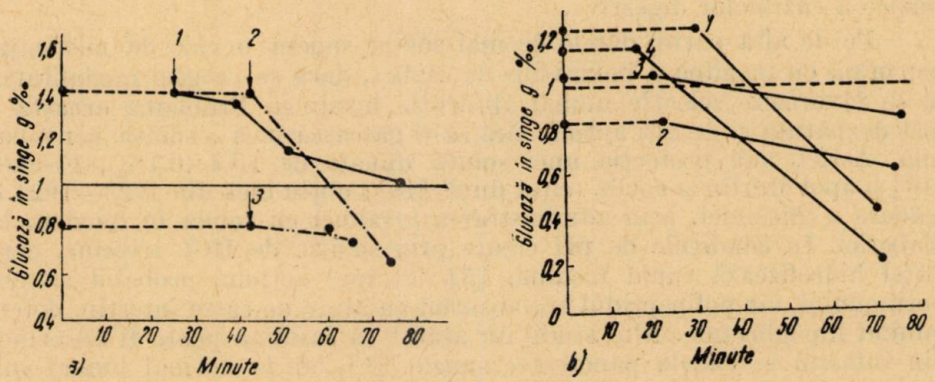


Fig. 7. — *a*) Curba glicemiei la șobolani normali maturi după administrare a 6 u.i. insulină + 1 ml albuș de ou direct în duoden (*1*, *2*); *idem* la șobolan ținut în prealabil la regim hipergras și lipsit de proteine (*3*). (Administrarea insulinei direct în duoden s-a făcut cu seringa practicînd — sub narcoză — o butonieră în peretele abdominal — cu închidere ulterioară prin agrafe).

b) Hipoglicemie la șobolani maturi după administrare intraduodenală de doze diferite de insulină în soluție fiziologică : *1* = 6 u.i. ; *2* = 8 u.i. ; *3* = 17 u.i. ; *4* = 21 u.i.

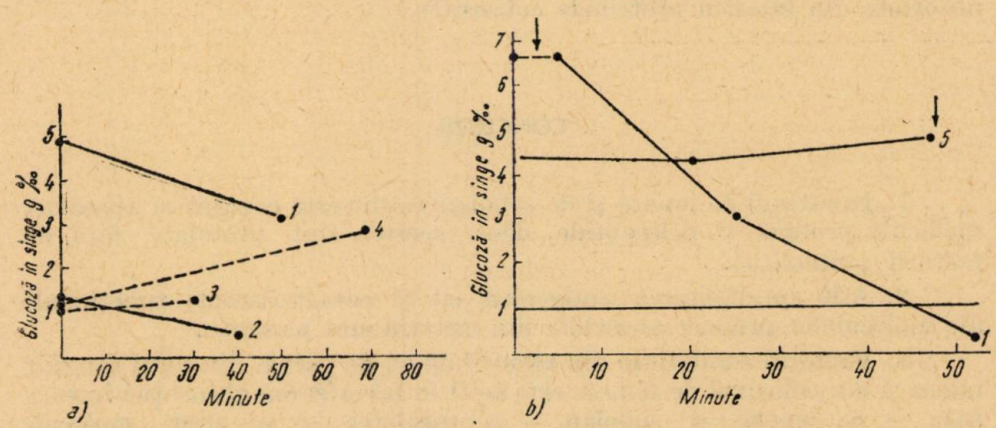


Fig. 8. — *a*) La șobolan diabetic prin alloxan (*1*) și la altul normal (*2*) alimentat în prealabil cu zahăr + lapte, se administrează cîte 8 u.i. insulină cu ser fiziologic intraduodenal ; se obține o scădere a glicemiei ; *3* și *4* = glicemia după alimentare cu zahăr + lapte la șobolani martori normali.

b) Șobolan diabetic prin alloxan consumă liber circa 20 u.i. insulină în amestec cu 10 ml albuș de ou de găină crud, bătut cu 1 g lapte praf. *1* = curba de scădere consecutivă a glicemiei la acesta ; *5* = șobolan diabetic martor.

6—8 u.i. *per oral*, respectiv 2—4 u.i. subcutanat, spre deosebire de dozele mari pe care le citează alţi autori în cercetări similare, anume 1 u.i. per gram la şoarece [29] sau 400 u.i. la purcel [1]. Tragem de aici concluzia că, sub protecţia acţiunii antitriptice a ovomucoidului din albuşul de ou, insulina era absorbită din intestin cu un randament apreciabil. Aceste date confirmă încă o dată capacitatea intestinului de a absorbi molecule mari integre şi că această absorbţie nu depinde de vîrstă, ci de eficienţa enzimelor proteolitice, adică fenomenul este supus cenzurei proteinoclazice a enzimelor digestive.

Pe de altă parte, datele de mai sus ar sugera o cale de medicaţie per orală cu insulină a bolnavilor de diabet, dacă se va găsi modalitatea să se favorizeze selectiv numai absorbţia insulinei. Problema aceasta a fost dezbătută şi de alţi autori, fără să-şi găsească încă o soluţie convenabilă. Astfel, sub protecţia unei soluţii diluate de HCl (0,1%), Fischer [16] şi apoi Murlin şi colab. (citat după [48]) obţin încă din 1923—1924 o scădere a glicemiei, prin administrarea insulinei cu sonda în duoden, la diabetici. În condiţiile de pH create prin soluţia de HCl, tripsina, care altfel hidrolizează rapid insulina [5], nu mai acţiona probabil asupra hormonului, iar polipeptidul era absorbit ca atare de către intestin, determinînd hipoglicemie. Alte studii au arătat că insulina poate fi absorbită din intestin la cîinele pancreatectomizat [4], iar la normal numai sub protecţia unui factor antitriptic [14] [25]. Observaţii similare au fost înregistrate la şobolan [33], la iepure [48] şi, în primele ore după naştere, la şoarece [29], la purcel [1] şi la viţel [43].

Rezultă de aici, mai întîi, că intestinul este capabil să absoarbă insulina, dacă molecula acesteia este protejată faţă de acţiunea enzimelor proteolitice, şi apoi că, în primele ore după naştere (uneori chiar după cîteva zile), ar exista o insuficienţă a enzimelor proteolitice la o serie de animale. Aceasta ar explica de ce la speciile citate în această lucrare sînt absorbite din intestin proteinele colostrale.

CONCLUZII

1. Intestinul de iepure şi de şobolan matur este capabil să absoarbă molecule proteice şi polipeptide, dacă acestea sînt protejate faţă de factorii proteolitici.

2. Atît specificitatea antigenică cît şi caracteristicile funcţionale ale moleculelor proteice absorbite din intestin sînt păstrate.

3. Factorul antitriptic din albuşul de ou de găină, din serul sanguin uman şi din colostrul de femeie este activ în favorizarea absorbţiei intestinale — la iepure şi şobolan — a insulinei şi a unor molecule proteice.

Prezentat la redacţie la 10 ianuarie 1966

Spitalul Dr. I. Cantacuzino, Laboratorul experimental, Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. Asplund, J. M., R. H. Grummer, P. H. Phillips, *Absorbtion of colostral gamma-globulins and insuline by the newborn pig*, J. Anim. Sci., **21**, 412 (1962).
2. Ardri, R., A. Courtin, *Pénétration intestinale des gamma-globulines*, Thérapie, **XVI**, 819 (1961).
3. Bangham, D. R., Terry, R. J. *The absorbtion of ^{131}I labelled homologous and heterologous serum proteins per orally to young rats*, Biochem. J., **66**, 579 (1957).
4. Bollman, J. L., Mann, F. C., *Enteral administration of insulin in normal dogs*, J. Med. Sci., **183**, 23 (1932).
5. Brambell, F. W. R., Halliday, R., Hemmings W. A., *Changes in 131—I labelled immune bovine gamma-globulin during transmission to the circulation after oral administration to the young rat*, Proc. roy. Soc. Biol., **53**, 477 (1961).
6. Brock, J. F., *Recent progres in human nutrition*, J. & A. Churchill Ltd., Londra, 1961, p. 169.
7. Burtin, P., *Immuno-electrophoretic analysis*, Elsevier Publ. Comp., Amsterdam, Londra, New York, 1964, p. 94.
8. Chișiu, N. Șt., *Aspecte taxonomice la nivel molecular. Criterii de antigenicitate*, Comunicare prezentată la Secția de biochimie a Soc. de fiziologie, mai 1966.
9. Chișiu, N. Șt., *Constituenți antigenici proprii și de origine sanguină în bila hepatică și veziculară umană*, St. cerc. biochim., **8**, 427 (1965).
10. Clark, S. L. Jr., *Ingeration of protein and colloidal materials by columnar absorbtive cells of the small intestine*, J. Biophys. Biochim. Cytol., **5**, 41 (1959).
11. Crane, C. W. A. Neuberger, *Digestion and absorbation of protein by normal man*, Biochem. J., **74**, 313 (1960).
12. Derblom, H., G. Nylander, *Uptake from the small intestine to the peripheral circulation of NaI^{131} and human serum albumin I^{131} in the rat under varying experimental conditions*, Acta chir. scand., **125**, 147 (1963).
13. Dixon, F. J., W. Weigle, J. J. Vazquez, *Metabolism and mammary secretion of serum proteins in the cow*, Lab. Invest., **10**, 216 (1961).
14. Driver, R. L., J. R. Marlin, *Factors in absorbtion of insulin from the alimentary tract*, Amer. J. Physiol., **132**, 281 (1941).
15. Fillipp, G., *Further studies on the question of the induction of immune tolerance using an orally administered antigen solution in the neonatal period*, Acta Allergologica, **20**, 47 (1956).
16. Fischer, N. F., *The absorption of insulin from the intestin, vagina and scrotal sac*, Amer. J. Physiol., **67**, 65 (1923—24).
17. Fraenkel-Conrat, H., R. C. Bean, E. D. Ducay, H. S. Olcott, *Isolation and characterization of a trypsin inhibitor from Lima Beans*, Arch. Biochim. Biophys., **37**, 393 (1952).
18. Freda, V. J., *Placental transfer of antibodies in man*, Amer. J. Obstet. Gynecol., **84**, 1756 (1962).
19. Frederico, E., H. F. Deutsch, *Studies on ovomucoid*, J. Biol. Chem., **181**, 499 (1949).
20. Graves, J. H., *Transfer of neutralizing antibody of colostrum to calves born of foot and mouth disease vacinated dams*, J. Immunol., **91**, 251 (1963).
21. Gray, I., M. Walzer, *Absorbția proteinelor și aminoacizilor*, în *Fiziol. med. și Biofizică*, Edit. medicală, București, 1963, p. 1204.
22. Halliday, R., *The absorbtion of antibodies from immune sera by the gut of the young rat*, Proc. roy. Soc. Biol., **143**, 408 (1955).
23. Halliday, R., *The absorbtion of antibodies from immune sera and from mixtures of sera by the gut of young rat*, Proc. roy. Soc. Biol., **148**, 92 (1957).
24. Halliday, R., R. A. Kekwick, *The selection of antibodies by the gut of the young rat*, Proc. roy. Soc. Biol., **153**, 279 (1961).
25. Harned, R. K., T. Nash, *The protection of insulin by antiproteases and its absorption from the intestine*, J. Biol. Chem., **97**, 443 (1932).
26. James, K., *A study of the alpha 2 -macroglobulin homologues of various species*, Immunology, **8**, 55 (1965).
27. Kaminski, M., O. Ouchterlony, *Études immunochimiques qualitatives et quantitatives des protéides du blanc d'œuf*, Bull. Soc. Chim. biol., **33**, 758 (1951).
28. Kaminski, M., *Études des ovoglobulines*, Thèse, Univ. Paris, 1956.

29. Kelly, W. A., *Passage of insulin through the wall of the gastrointestinal tract of the infant mouse*, Nature (London), **186**, 971 (1960).
30. Kunitz, M., *Crystallin soybean trypsin inhibitor. II. General properties*, J. Gen. Physiol., **29**, 149 (1946).
31. Larson, B., D. C. Gillespie, *Origin of the major specific proteins in milk*, J. Biol. Chem., **227**, 565 (1957).
32. Larson, B., *Transfer of specific blood serum proteins to lacteal secretions near parturition*, J. Dairy Sci., **41**, 1033 (1958).
33. Lasch, F., E. Schonbruner, *Experimentelle Untersuchungen über die enterale Insulinoresorption*, Arch. f. exp. Path. u. Pharmakol., **100**, 469 (1936).
34. Lineaweaver, A., C. W. Murray, *Identification of the trypsin inhibitor of egg white with ovomucoid*, J. Biol. Chem., **171**, 565 (1947).
35. Micușan, V., L. Buzilă, *Relații de antigenitate între proteinele serice materne, imunoglobulinele colostrale și proteinele serice ale nou-născutului la bovine*, St. cerc. biochim., **7**, 213 (1964).
36. Mouton, R. F., L. L. Margadant, R. A. Collet, P. Rowinsky, M. Bein, *Transfert oral de gamma-globulines chez le lapin et le nourrisson*, Bull. Soc. Chim. Biol., **139**, Suppl. 1 (1957).
37. Muralt, Von G., D. L. Roulet, *Immuno-electrophoretic studies of human amniotic fluid, meconium and electrophoretic analysis*, Elsevier Publ. Comp., Amsterdam, London, New York, 1964.
38. Murphy, F. A., O. Alung, J. W. Osebold, E. J. Carrol, *Gamma-globulins of bovime lacteal secretions*, Arch. Biochem. Biophys., **108**, 230 (1964).
39. Necheles, H., *Relationships between hepatic and pancreatic function*, Amer. J. Gastroenterol., **40**, 148 (1963).
40. Nugent, F. W., W. A. Atendido, *The role of antienzymes in the acute pancreatitis treatment*, Amer. J. Gastroenterol., **43**, 437 (1965).
41. Osserman, E. F., *A modified technique of immunoelectrophoresis facilitating the identification of specific precipitin arcs*, J. Immunol., **84**, 93 (1960).
42. Pierce, A. E., *Further studies on proteinuria in the newborn calf*, J. Physiol., **155**, 136 (1961).
43. Pierce, A. E., P. C. Risdall, B. Shaw, *The absorption of orally-administered insulin by the newborn calf*, J. Physiol., **171**, 203 (1964).
44. Pierce, A. E., A. Feinstein, *Biophysical and immunological studies on bovin immune globuline with evidence for selective transport within the mammary gland from maternal-plasma to colostrum*, Immunology, **8**, 106 (1965).
45. Rangel, H., *Study of the cross-reaction between rabbit antibovine serum albumin, antibodies and equine serum albumin*, Immunology, **8**, 88 (1965).
46. Schneegans, E., G. De Muralt, Cl. Dierbeimer, *Maturation des immuno-globulines chez le nouveau-né et le prématuré*, Arch. Franc. Pédiat., **5**, 663 (1962).
47. Scott, D. A., *The action of trypsin on insulin*, J. Biol. Chem., **63**, 641 (1925).
48. Speth, R. N., H. J. Cristian, *Absorption of insulin from the gastrointestinal tract of the rabbit*, Diabetes, **12**, 243 (1963).
49. Vangham, W. T., *The practice of allergy*, ed. 2, Mosby, Saint Louis, 1948.
50. Veghelyi, P. V., *Pancreatic function and protein deficiency*, Acta paediatrica, **36**, 128 (1948).
51. Vitale, J. J., D. M. Hegsted, M. Zanicheck, *Some nutritional effects on the metabolism of the gastrointestinal mucosa*, Amer. J. Nutr., **8**, 156 (1960).
52. Weijers, E. A., J. H. Van Der Kamer, *Some biochemical investigations into the case of wheat sensitivity in celiac disease*, Gatroenterology, **38**, 587 (1960).
53. Werner, B., *Peptic and trypeptic capacity of the digestive glands in the newborn. Comparison between prenative and full-term infants*, Acta Paediatrica, **35**, Suppl. 6 (1948).
54. Zimmermann-Nielsen, T., Choen Heyder, *Rate of disappearance of protein from the small intestine in vivo*, Biochem. Biophys, Acta, **63**, 201 (1962).

ST. CERC. BIOCHIM., 9, 3, p. 277–281 (1966)

DEPLASAREA POTASIULUI ŞI SODIULUI DIN MUŞCHIUL STRIAT DE BROASCĂ ÎN CONTRACŢIE LIBERĂ ŞI CONTRACŢIE CU TRAVALIU MECANIC

DITA COTARIU şi TRAIAN RĂDULESCU

612.817.2

Rezumat. — S-a urmărit ieşirea potasiului şi sodiului din muşchiul gastrocnemian de broască, excitat electric direct, *in situ*, cu sau fără efectuare de travaliu mecanic. S-a stabilit că muşchiul excitat cedează soluţiei de zaharoză în care este imersat o cantitate de potasiu mai mare decît muşchiul martor în repaus, şi care creşte în funcţie de numărul de impulsuri primite. În anumite condiţii, pentru acelaşi număr de impulsuri, muşchiul supus contracţiei cu travaliu mecanic cedează mai mult potasiu decît muşchiul în contracţie liberă. Cantităţile de sodiu cedate de muşchiul excitat, respectiv în repaus, sînt de acelaşi ordin de mărime. Se discută corelaţia dintre ieşirea potasiului şi performanţa mecanică a muşchiului.

Excitarea tetanică a muşchiului are ca rezultat modificarea conţinutului ionic intracelular, exprimată printr-un cîştig de sodiu şi o pierdere de potasiu. Acest fapt a fost semnalat de Fenn şi Cobb [1] în urma excitării prin sciatic a muşchilor de pisică. Hodgkin [2] a arătat că în cursul excitaţiei, într-un interval de timp scurt, se produce o intrare brutală de sodiu, urmată de o ieşire importantă de potasiu. Măsurînd cantitativ aceste fluxuri la fibrele izolate de muşchi semitendinos de broască, Hodgkin şi Horowicz [3] au constatat, cu ajutorul ^{24}Na şi ^{42}K, că schimburile ionice cresc în cursul activităţii musculare. Ei consideră aceste schimburi ionice ca fenomene de membrană legate de manifestările electrice ale activităţii musculare, părere împărtăşită şi de alţi autori. Fleckenstein [4] aduce însă unele argumente în favoarea unei cuplări a schimbului Na-K cu procesul contractil. Problema dacă activitatea contractilă şi cheltuiala respectivă de energie au vreo influenţă asupra schimbului ionic a fost cercetată şi de Gillis [5], pe muşchi sartorius de broască supus la diferite tipuri de tetanizare. El arată că modificările conţinutului ionic, puse în evidenţă imediat după încetarea tetanizării, nu depind de performanţele mecanice diferite ale muşchiului ci numai de numărul de impulsuri primite. Pe de altă parte, Sréter [6], analizînd conţinutul ionic de-a lungul fibrei musculare de gastrocnemian de şobolan, supus *in situ* unei contracţii izotonice sau izometrice îndelungate, constată o distribuţie ionică neuniformă, care variază cu travaliul efectuat.

Avînd în vedere că participarea cationilor la procesul contractil nu este suficient precizată, ca şi faptul că majoritatea cercetărilor au fost

efectuate pe muşchi izolaţi sau în condiţii de excitare pînă la oboseală, am considerat că excitarea *in situ*, în condiţii experimentale mai fiziologice poate să ne dea unele indicaţii în legătură cu această problemă. În lucrarea de faţă ne-am propus să urmărim cu ajutorul testului exosmozei [7] deplasările sodiului şi potasiului din muşchiul gastrocnemian de broască în condiţiile unor contracţii izotonice libere sau cu efectuare de travaliu mecanic.

MATERIAL ŞI METODE

Experienţele s-au efectuat pe muşchi gastrocnemian de broască *Rana ridibunda*. S-a lucrat pe loturi de cîte 10 broaşte, în greutate de aproximativ 30 g, muşchii avînd greutăţi cuprinse între 0,3 şi 0,5 g. La toate loturile, un muşchi a fost excitat *in situ*, cu sau fără efectuare concomitentă de travaliu mecanic, iar celălalt a servit drept martor. În cursul experienţelor, cei doi muşchi simetrici au fost supuşi aceloraşi manipulări, cu excepţia că martorul rămînea totdeauna în repaus. Contracţiile izotonice s-au obţinut prin aplicarea unor electrozi de argint clorurat, conectaţi la un generator de impulsuri, în regiunile piciorului corespunzătoare extremităţilor proximală şi distală ale muşchiului gastrocnemian. S-a aplicat un număr diferit de impulsuri, cu frecvenţa de 5/s, cu durata de 5 ms. Pentru contracţia izotonică cu travaliu mecanic, s-a ataşat de picior o greutate de 10, respectiv 100 g, în dreptul inserţiei tendonului lui Achile. Experienţele s-au efectuat pe nouă loturi de broaşte. La fiecare lot s-au folosit următoarele condiţii de excitare :

(1) 300 imp.	(4) 300 imp. + 10 g	(7) 300 imp. + 100 g
(2) 1 500 „	(5) 1 500 „ + 10 g	(8) 1 500 „ + 100 g
(3) 3 000 „	(6) 3 000 „ + 10 g	(9) 3 000 „ + 100 g

Muşchii prelevaţi imediat după încetarea excitării, erau introduşi în pahare Berzelius conţinînd 10 ml soluţie 0,25 M de zaharoză şi menţinuţi 30 min la temperatura laboratorului, într-un curent de carbogen (O_2 95 %, CO_2 5 %). După îndepărtarea muşchilor, se determina în soluţiile obţinute cantitatea de sodiu şi potasiu prin citiri la fotometrul cu flacără Zeiss. Rezultatele sînt exprimate în µg şi reprezintă cantităţile de sodiu, respectiv de potasiu, difuzate din muşchi în 10 ml soluţie, în decurs de 30 minute.

Muşchii simetrici în repaus cedează soluţiei de imersie cantităţi concordante de sodiu şi potasiu.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Rezultatele obţinute la loturile *1*, *2* şi *3* (contracţie liberă sub influenţa a 300, 1 500 şi 3 000 de impulsuri, respectiv martor în repaus) sînt redate în tabela 1.

După cum reiese din datele prezentate, cantitatea de potasiu difuzat este mai mare la muşchiul excitat decît la muşchiul simetric în repaus, în toate variantele experimentale. Totodată, examinînd valorile medii Δ (care reprezintă diferenţa dintre cantităţile medii de potasiu difuzat din muşchiul în contracţie şi muşchiul în repaus) se constată că ieşirea potasiului variază cu numărul de impulsuri primite de muşchi, şi anume creşte cu cît numărul de impulsuri este mai mare.

Aceste date reflectă faptul că, în urma excitării, potasiul părăseşte celula musculară, acumulîndu-se în spaţiul extracelular, de unde poate difuza cu uşurinţă în soluţia de imersie. Rezultatele noastre sînt în concordanţă cu scăderea conţinutului de potasiu, pusă în evidenţă de Gillis [5], în fibrele musculare de sartorius de broască izolat, excitat şi menţinut într-o soluţie salină.

Tabela 1

Sodiul şi potasiul difuzat din muşchii gastrocnemieni de broască în 10 ml soluţie zaharoză 0,25 M, în interval de 30 min (un muşchi în contracţie liberă, un muşchi în repaus; valorile sînt exprimate în μg per 10 ml şi reprezintă media unui lot)

Contracţie liberă			Repaus		Δ ±	
Nr. impulsuri	Na	K	Na	K	Na	K
300	182,0	109,4	192,0	77,0	−10,0	+32,4
1 500	158,0	227,0	176,0	183,0	−18,0	+44,0
3 000	153,6	236,8	137,0	144,0	+16,6	+92,8

Tabela 2

Sodiul şi potasiul difuzat din muşchii gastrocnemieni de broască în 10 ml soluţie zaharoză 0,25 M, în interval de 30 min (un muşchi în contracţie cu travaliu mecanic (greutate de 10 g), un muşchi în repaus; valorile sînt exprimate în μg per 10 ml şi reprezintă media unui lot)

Contracţie cu travaliu mecanic			Repaus		Δ ±	
Nr. impulsuri	Na	K	Na	K	Na	K
300	91,6	150,4	93,4	118,5	−1,8	+31,9
1 500	130,2	134,4	124,7	77,7	+5,5	+56,7
3 000	135,0	155,4	136,5	71,3	−1,5	+84,1

Tabela 3

Sodiul şi potasiul difuzat din muşchii gastrocnemieni de broască în 10 ml soluţie zaharoză 0,25 M, în interval de 30 min (un muşchi în contracţie cu travaliu mecanic (greutate de 100 g), un muşchi în repaus; valorile sînt exprimate în μg per 10 ml şi reprezintă media unui lot)

Contracţie cu travaliu mecanic			Repaus		Δ ±	
Nr. impulsuri	Na	K	Na	K	Na	K
300	167,3	161,1	188,7	112,5	−21,4	+ 48,6
1 500	138,0	218,8	144,3	123,7	− 6,3	+ 95,1
3 000	154,2	221,9	155,7	106,8	− 1,5	+115,1

În ceea ce priveşte difuzia sodiului, valorile obţinute la muşchiul excitat sînt practic de acelaşi ordin de mărime ca la muşchiul în repaus. La prima vedere, acest rezultat pare surprinzător, deoarece este cunoscut faptul că în urma excitării are loc o intrare de sodiu în celula musculară [1—3]. Pe de altă parte, se ştie că în muşchi există două fracţiuni de sodiu, cu mobilităţi diferite [8] [9]: una corespunde unei difuzii rapide din spaţiul extracelular, iar cealaltă unei pierderi lente a sodiului celular [10]. În conformitate cu aceste date, era probabil ca în condiţiile unei imersări de durată relativ scurtă, ca aceea folosită în experienţele noastre, să se pună în evidenţă o cantitate mai mică de sodiu difuzat din muşchii excitaţi decît din martorii în repaus, ca urmare a diminuării fracţiunii mobile din spaţiul extracelular. În realitate, datele noastre nu sînt concludente. Acest fapt poate fi explicat dacă ţinem seama de unele rezultate ale lui Harris şi Steinbach [11], care arată că, în prima oră de extracţie cu apă (viteza de ieşire a sodiului în apă sau soluţie de zaharoză este similară), o mare parte din sodiul intracelular părăseşte celula musculară. Este foarte probabil deci că, în condiţiile noastre de lucru, concomitent cu difuzia sodiului extracelular a avut loc şi ieşirea unei părţi din sodiul pătruns în fibra musculară în urma excitării, nivelînd astfel întrucîtva diferenţele.

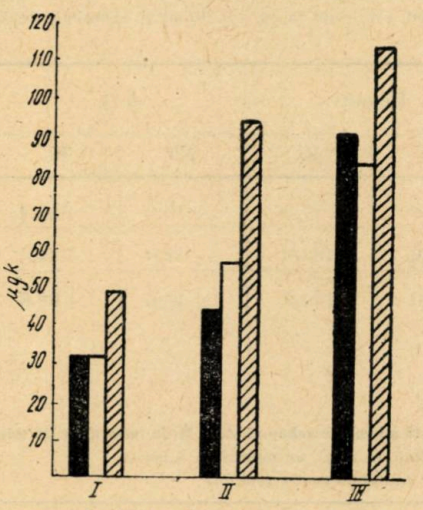


Fig.1. — Diferenţele medii Δ de potasiu corespunzătoare muşchilor în contracţie simplă şi în contracţie cu travaliu mecanic.

contracţie liberă ▢ contracţie cu greutate de 10 g

contracţie cu greutatede 100 g.

I = 300 imp.; *II* = 1 500 imp.; *III* = 3 000 imp.

Rezultatele obţinute la loturile *4*, *5*, *6* şi *7*, *8* şi *9* (contracţia piciorului încărcat cu o greutate de 10, respectiv de 100 g, sub influenţa a 300, 1 500 respectiv 3 000 impulsuri, faţă de martorul în repaus) sînt redate în tabelele 2 şi 3.

După cum reiese din datele prezentate, cantitatea de potasiu difuzat este mai mare la muşchiul supus contracţiei cu travaliu mecanic decît la muşchiul simetric în repaus, în toate variantele experimentale. Se constată şi de astă dată că, în funcţie de numărul de impulsuri primite, cantitatea de potasiu difuzat creşte. Şi în acest caz, valorile sodiului difuzat din muşchiul excitat şi din muşchiul în repaus sînt practic de acelaşi ordin de mărime.

Examinînd diferenţele medii Δ pentru potasiu (tabelele 1, 2 şi 3) se constată că, la acelaşi număr de impulsuri primite, valorile potasiului difuzat din muşchii în contracţie liberă şi din muşchii încărcaţi cu o greutate de 10 g sînt foarte apropiate. Dimpotrivă, la toate cele trei variante de excitare studiate, muşchii încărcaţi cu 100 g prezintă valori mai mari. În figura 1 sînt prezentate comparativ, pentru fiecare variantă de excitare, diferenţele medii Δ ale potasiului difuzat.

După cum reiese din figură, ieșirea potasiului depinde nu numai de numărul de impulsuri primite de mușchi, ci și de performanța mecanică a acestuia. Aceste rezultate sînt în concordanță cu unele date ale lui Sréter [6], care găsește o scădere a conținutului de potasiu în mușchiul gastrocnemian de șobolan, în contracție izometrică (în special la o tensiune musculară de 300 g), în comparație cu mușchii în contracție izotonică, încărcați cu o greutate de 7 g.

Datele noastre par să indice, așa cum au arătat și alți autori, că eliberarea potasiului în cursul activității musculare nu depinde exclusiv de fenomene de membrană, ci ar fi legată și de participarea sa în procesul contractil.

Prezentat la redacție la 19 martie 1966

Institutul de biochimie al Academiei Republicii Socialiste România, București

BIBLIOGRAFIE

1. Fenn, W. O., Cobb, D. M., *Electrolyte changes in muscle during activity*, Amer. J. Physiol. **115**, 345–356 (1936).
2. Hodgkin, A. L., *The ionic basis of electrical activity in nerve and muscle*, Biol. Rev., **26**, 339–409 (1951).
3. Hodgkin, A. L. și Horowicz, P., *Movements of Na and K in single muscle fibres*, J. Physiol., **145**, 405–432 (1959).
4. Fleckenstein, A., *Die Biochemie der Muskelerregung*, Arch. exper. Path. u. Pharmakol., **228**, 46–67 (1956).
5. Gillis, J. M., *Les déplacements ioniques dans le muscle strié isolé après tétanisation répétée*, Arch. Int. Physiol. Biochim., **72**, 124–153 (1964).
6. Sréter, F. A., *Distribution of water, sodium and potassium in resting and stimulated mammalian muscle*, Can. J. Biochem., **41**, 1035–1045 (1963).
7. Rădulescu, T., Cotariu, D., *The effect of denervation, narcosis and curarization on cation movements in striated muscles*, Rev. roum. Biochim., **2**, 343–347 (1965).
8. Mond, R., Netter, H., *Über die Regulation des Natriums durch den Muskel*, Arch. Physiol., **230**, 42–69 (1932).
9. Boyle, P. J., Conway, E. J., Kane, F., O'Reilly, H. J., *Volume of the interfibre spaces in frog muscle and the calculation of concentrations in the fibre water*, J. Physiol., **99**, 401–414 (1941).
10. Harris, E. J., *Transport and accumulation in biological systems*, London, Butterworths scientific publ., 1956, p. 156.
11. Harris, E. J., Steinbach, H. B., *The extraction of ions from muscle by water and sugar solutions with a study of the degree of exchange with traces of the sodium and potassium in the extracts*, J. Physiol., **133**, 385–401 (1956).

ST. CERC. BIOCHIM., 9, 3, 283–288 (1966)

MODIFICAREA PROPRIETĂŢILOR CHIMICE ALE CITOCROMULUI *c* SUB ACŢIUNEA UNOR SUBSTANŢE CITOSTATICE ALCHILANTE

GABRIELA DINESCU

612.398 : 612

Rezumat. — S-a urmărit *in vitro* acţiunea unor agenţi citostatici alchilanţi (sarcolizină, Tiotepa, Tem, Clafen) asupra vitezei de oxidare şi capacităţii de a fi redus a citocromului *c*, la pH 8, 7,5, 7 şi 6,5. Oxidarea şi reducerea s-au urmărit spectrofotometric, utilizîndu-se ca agent de oxidare H_2O_2, iar de reducere ascorbatul.

Rezultatele arată că citostaticele utilizate produc o scădere progresivă a capacităţii de a fi redus a citocromului în funcţie de pH ; reducerea enzimei este cel mai intens inhibată de alchilanţi la pH 6,5. Oxidarea citocromului *c* este mai lentă în prezenţa agenţilor alchilanţi ; la pH 7,1 în prezenţa H_2O_2 se observă formarea unui complex colorat sarcolizină-citocrom.

Rezultatele sînt discutate în legătură cu diferenţa de pH între ţesuturile normale şi cele canceroase.

Substanţele citostatice folosite în tratamentul tumorilor maligne îşi exercită acţiunea prin modificarea mai multor procese biochimice. Clasa cea mai răspîndită de citostatice o formează agenţii alchilanţi (azotiperite, etilen-imine, esteri sulfonici, epoxizi), care au capacitatea de a alchila combinaţiile cu grupări NH_2, COOH şi SH libere ; dintre componenţii celulari, ei se combină cu amino-acizii, proteinele şi acizii nucleici [1], modificînd astfel o serie de procese vitale ale celulei. Unul dintre cele mai importante procese biochimice influenţate de citostatice îl constituie respiraţia celulară. Deoarece acest proces implică un mare număr de reacţii enzimatice, se consideră că acţiunea citostaticelor se exercită la nivelul activităţii enzimatice şi se datoreşte fie inhibiţiei formării enzimelor (sinteză proteică), fie inactivării enzimelor [2].

Lucrarea de faţă a avut drept scop studiul acţiunii unor citostatice alchilante asupra vitezei de oxidare şi capacităţii de reducere a citocromului *c*. Ţinînd seama de diferenţa de pH dintre ţesuturile normale şi cele tumorale [3], determinările s-au făcut la mai multe valori de pH. Ca citostatice s-au utilizat : sarcolizina, Tem, Tiotepa şi Clafen.

MATERIAL ŞI METODĂ

Enzima. S-a utilizat citocrom *c* NBC, cu un conţinut în Fe de 0,34 % ; s-a lucrat cu o diluţie de 0,036 %, preparată în tampon Tris, pH 8, 7,5, 7 şi 6,5.

Citostatice. S-au utilizat următoarele substanţe : sarcolizină şi Tiotepa (preparate în Laboratorul de farmacologie al I.O.B.), Clafen (Fabrica de antibiotice, Iaşi) şi Tem (Höchst).

Soluţiile au fost preparate în ser fiziologic şi s-au utilizat cantităţi conţinînd 2,5 mg/probă (cu excepţia Temului care s-a utilizat în doză de 0,75 mg/probă).

Mod de lucru. Reducerea citocromului *c* s-a făcut cu o soluţie 5% de ascorbat (Reanal) în tampon Tris; s-a determinat raportul dintre forma redusă (550 mμ) şi cea oxidată (565 mμ) a citocromului [4]. Amestecul de reacţie a constat din 1,50 ml soluţie de citocrom *c*, 0,50 ml soluţie de citostatic şi 0,1 ml ascorbat.

Oxidarea citocromului *c* s-a determinat spectrofotometric, urmărindu-se extincţia soluţiei de citocrom *c* la lungimea de undă corespunzătoare bandei Soret a enzimei oxidate (407 mμ) [5]. Fiecare probă a conţinut 1,50ml soluţie de citocrom *c*, 0,50 ml soluţie de citostatice şi 0,05 ml H_2O_2 1% (preparată din soluţie Merck 30%); citirile s-au făcut din 2 în 2 min, timp de 10 min.

În toate determinările citocromul s-a incubat cu citostaticul 45 min la 37° C; citirile s-au făcut imediat după adăugarea agenţilor de oxidare şi reducere, utilizînd cuve de 0,5 cm şi spectrofotometrul universal Zeiss.

REZULTATE

Reducerea citocromului c cu ascorbat. Rezultatele, reprezentate în figura 1, arată o scădere progresivă a capacităţii de a fi redus a citocromului *c* în funcţie de pH, raportul dintre forma redusă şi cea oxidată a enzimei (R), care e 7 la pH 8, scade la pH 6,5 pînă la 4,34. Prezenţa citostaticelor determină o scădere a lui R, cu atît mai pronunţată cu cît pH-ul este mai acid; la pH 8 se observă o uşoară creştere a raportului. La pH 7,5 R scade cu aproximativ 30% în prezenţa sarcolizinei; scăderea este de 42% la pH 7 şi de 50% la pH 6,5. Tiotepa produce o scădere de aprox. 30% a lui R numai la pH 7 şi 6,5, iar clafenul numai la pH 6,5. Temul nu modifică valoarea lui R la nici un pH utilizat. Se constată deci că, la pH-uri scăzute, citostaticele — în special sarcolizina — inhibă în proporţii variate reducerea enzimei.

Oxidarea citocromului c în prezenţă de H_2O_2. În figura 2 se ilustrează scăderea extincţiei la 407 m μ a soluţiei de citocrom c, produsă de peroxidul de hidrogen; determinările sînt făcute la pH 8, 7,5, 7 şi 6,5.

La pH alcalin peroxidul de hidrogen nu modifică decît foarte puţin extincţia citocromului *c* [6]; pe măsura ce pH-ul scade, se observă însă o sensibilitate crescută a enzimei faţă de acţiunea H_2O_2. Oxidarea citocromului este mai lentă în prezenţa agenţilor alchilanţi.

O comportare specială o prezintă sarcolizina: de la pH 7 se observă apariţia unei culori intens portocalii, ceea ce pare să indice formarea unui complex colorat cu citocromul. În figura 3, este reprezentată extincţia amestecului citocrom-sarcolizină în prezenţa H_2O_2 la diferite pH-uri; în acest caz s-a lucrat cu o concentraţie de citocrom de 0,23 mg/probă (păstrînd între sarcolizină şi enzimă aceeaşi proporţie). Se constată că la pH 7,1 extincţia amestecului începe să crească. Reacţia de culoare nu este dată de sarcolizină singură în prezenţa soluţiei de citocrom sau în prezenţa ionilor de fier (după adăugarea H_2O_2). Pentru a se vedea dacă reacţia de culoare se datoreşte numai ionilor de Fe s-a urmărit reacţia sarcolizinei cu diverse cantităţi de $FeCl_3$, începînd cu o cantitate de Fe Cl_3 al cărei conţinut în fier să corespundă celui din probele cu citocrom; rezultatele sînt date în tabela 1.

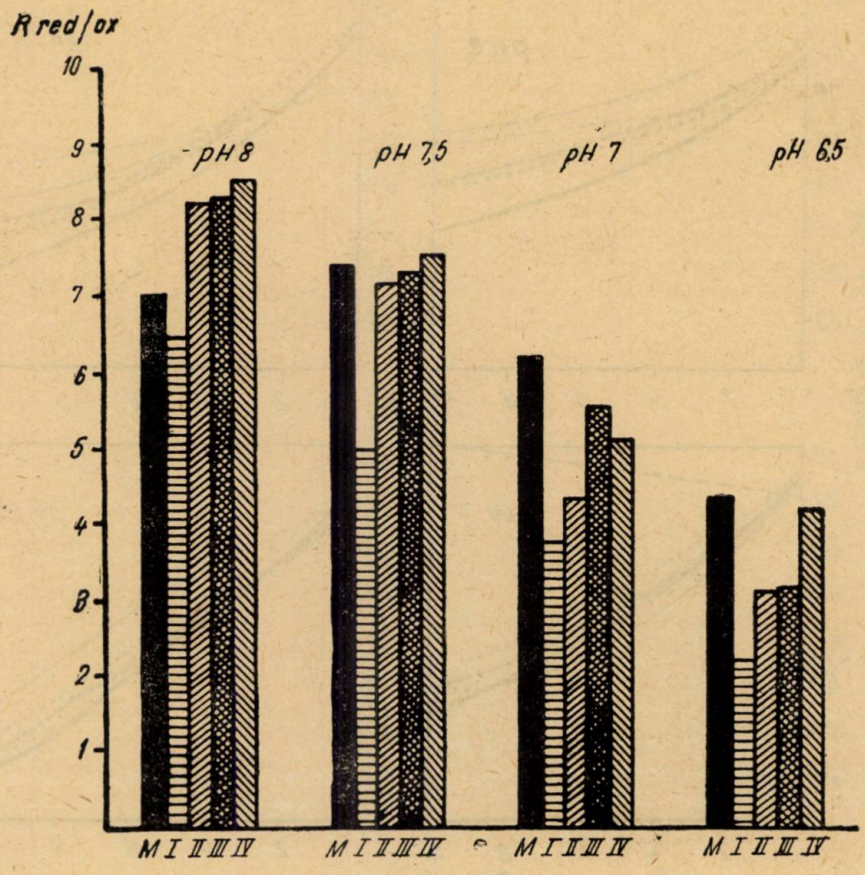


Fig. 1. — Influența unor citostatice asupra capacității de reducere a citocromului *c* la diferite pH-uri, sub acțiunea ascorbatului.

M = Martor
I = Sarcolizină
II = Tiotepa
III = Clafen
IV = Tem

Tabela 1

Influența concentrațiilor diferite de Fe^{3+} asupra apariției reacției de culoare a sarcolizinei în prezența H_2O_2

Concentrația Fe^{3+} mg/probă		Reacția cu sarcolizină
Din citocrom	Din $FeCl_3$	
0,000782	—	+
—	0,000782	—
—	0,0020	—
—	0,0061	—
—	0,020	—
—	0,051	—
—	0,10	slab +
—	0,20	+

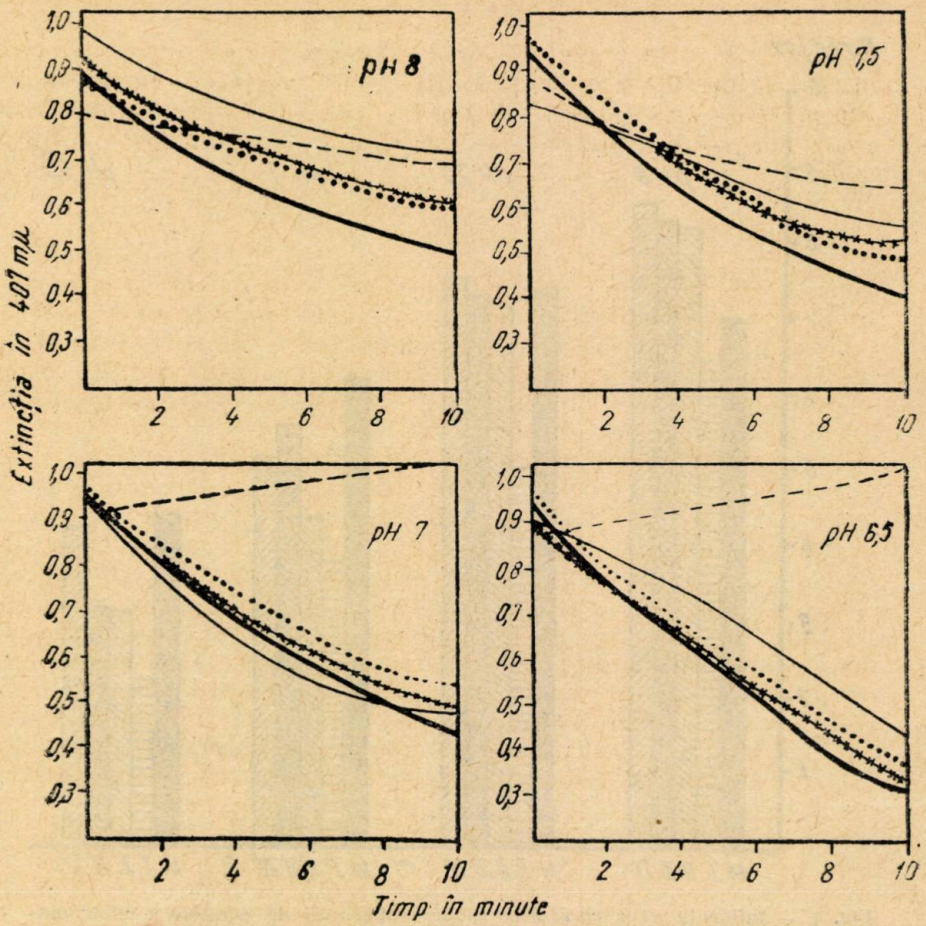


Fig. 2. — Efectul H_2O_2 asupra citocromului *c*, în prezența unor citostatice la diferite pH-uri.

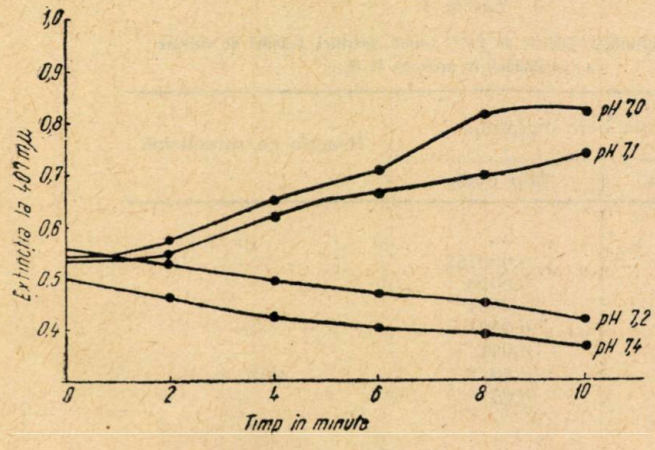


Fig. 3. — Oxidarea citocromului *c* în prezența sarcolizinei la diferite pH-uri.

Se constată că în absența citocromului sarcolizina nu reacționează cu cantitatea echivalentă de fier din citocrom; reacția de culoare apare numai în prezența unei cantități de fier de aproximativ 250 ori mai mare decît cea din citocrom. Maximul de intensitate al culorii apare după 10 minute de la introducerea H_2O_2.

DISCUȚII

Rezultatele obținute, care arată că atît oxidarea cît și reducerea citocromului *c* sînt modificate în prezența agenților alchilanți, pledează în favoarea ipotezei că enzimele sînt dezactivate de către citostatice; datorită locului pe care citocromul *c* îl ocupă în lanțul transporturilor de electroni, dezactivarea lui parțială poate duce la scăderea respirației celulare, fapt observat în țesuturi tratate cu citostatice [2].

Este interesant că dezactivarea citocromului *c* sub acțiunea alchilanților este mai pronunțată la pH acid, deoarece se știe că tumorile se caracterizează printr-un pH mai acid decît țesuturile normale [3]. Scăderea pH-ului în tumori se datorește în special formării crescute de acid lactic în cursul procesului intens de glicoliză; determinări ale lui Kahler și Roberson (citat din [3]) arată că pH-ul hepatomului e 7, în comparație cu pH 7,4 al ficatului normal, și că la administrarea unui exces de glucoză pH-ul hepatomului scade pînă la 6,4. Reducerea și oxidarea citocromului *c* sînt modificate de agenții alchilanți și la pH-uri în jurul celui fiziologic, dar mai pronunțat în mediu acid; ar fi deci posibil ca acțiunea mai eficace a citostaticelor asupra țesuturilor tumorale decît asupra celor normale să fie datorită în parte dezactivării mai intense a enzimelor de oxido-reducere în mediu acid.

Rezultatele negative obținute cu Temul se datoresc probabil faptului că s-a lucrat cu o concentrație mai scăzută, datorită solubilității reduse a produsului întrebuințat.

Compusul colorat care se formează la pH 7,1 între sarcolizină și citocrom în prezența H_2O_2 pare să indice formarea unui complex în care este implicat fierul; această concluzie reiese din faptul că în absența citocromului sarcolizina reacționează doar cu cantități foarte mari de fier. Este posibil ca prin alchilarea catenelor ciclului porfirinic sub acțiunea sarcolizinei hemul să devină mai expus la acțiunea agentului oxidant și să permită formarea unui compus cu sarcolizina prin intermediul fierului; acest lucru rămîne însă să fie cercetat mai amănunțit.

CONCLUZII

Se constată că sub acțiunea unor agenți citostatici alchilanți (sarcolizină, Tem, Tiotepa, Clafen) capacitatea de reducere a citocromului *c* scade o dată cu scăderea pH-ului; inactivarea oxidativă a enzimei sub acțiunea H_2O_2 este mai lentă în prezența substanțelor anticanceroase folosite.

Este posibil ca în țesuturile în care pH-ul este mai scăzut și activitatea catalazei mai redusă, citocromul să fie mai sensibil la acțiunea agenților citostatici.

Prezentat la redacție la 21 decembrie 1965 *Institutul oncologic, București*

BIBLIOGRAFIE

1. R. Demmler, *Vergleich der Primärwirkungen von Radiomimetika und ionisierenden Strahlen*, Strahlentherapie, **4**, 695 (1957).
2. G. Wheeler, *Studies related to the mechanisms of action of cytotoxic alkylating agents*, Can. Res., **22**, 651 (1962).
3. J. Greenstein, *Biochemistry of cancer*, Acad. Press Inc., ed. II, New York, 1954, p. 452.
4. G. K. Paul, în *Methods in Enzymology*, sub redacția S. Colowick and N. Kaplan, Acad. Press Inc., New York, vol. III, 1955, p. 736.
5. B. Hardesty, H. Mitchel *The interaction of fatty acids with mammalian cytochrome c*, Arch. Biochem. Biophys., **100**, 1 (1963).
6. G. Dinescu, A. Curiguț, *Interacțiunea citocromului c cu fosfolipidele țesulare*, St. cerc. biochim., **8**, 181 (1965).

ST. CERC.BIOCHIM., 9, 3, 289–298 (1966)

CERCETAREA IMUNOCHIMICĂ A ÎNGLOBĂRII FRACŢIUNILOR PROTEICE DIN SERUL SANGUIN UMAN ÎN COACERVATUL CU ACACIA

CONSIDERAŢII ASUPRA MECANISMULUI DE FORMARE A COACERVATELOR

DAN MOŢET

612.124 : 576.8.097

Rezumat. — Prin cercetări imunochimice se confirmă rezultatele anterioare asupra coacervabilităţii fracţiunilor proteice din serul sanguin uman normal şi denaturat. Totodată, se constată că, prin coacervare, proteinele suferă o denaturare. Pe baza acestui fapt, coroborat cu date asupra formării unor complexe între substanţele care participă la formarea coacervatului, se discută actuala ipoteză asupra mecanismului de formare a coacervatelor, aducîndu-se un nou punct de vedere asupra acestui mecanism.

Cel care menţionează pentru prima oară coacervatele cu ser sanguin este N.E. Feldman [1]. Cercetarea mai aprofundată a coacervatelor cu ser sanguin a fost însă iniţiată de către E. Macovschi şi M. Cârsteanu [2] care au arătat că prin acidulare se obţine un coacervat între serul sanguin şi acacia. Acest coacervat încorporează diferite substanţe (roşu neutru, roşu de Congo, albastru de metilen, albastru de briliant cresil), iar vechimea şi temperatura de păstrare a serului influenţează gradul său de hidratare.

Pornind de la această lucrare, am arătat în cîteva articole anterioare [3–5] că proprietatea fracţiunilor proteice din serul sanguin uman de a coacerva cu acacia este dependentă atît de natura acestor fracţiuni, cît şi de starea lor, nativă sau denaturată. Astfel, albuminele sînt mult mai coacervabile decît globulinele ; dintre acestea din urmă, cele care coacervează sînt pseudoglobulinele, în timp ce euglobulinele sînt practic necoacervabile în condiţiile noastre de lucru. În urma denaturării termice, albuminele au tendinţa de a deveni mai puţin coacervabile cu acacia, pe cînd globulinele devin mai coacervabile. Cele mai mari modificări se observă la nivelul beta-globulinelor care, în stare nativă, sînt practic necoacervabile, pe cînd după o denaturare timp de 30 de minute la 60° C aproape 50% din această fracţiune este inclusă în coacervat [5].

Prin experienţele prezentate în această lucrare am căutat să stabilim, la nivelul fracţiunilor antigenice, coacervabilitatea proteinelor serice şi totodată să tragem unele concluzii din seria de lucrări efectuate de noi asupra proprietăţii de a coacerva a acestor proteine.

MATERIALE ȘI METOD

Coacervarea proteinelor din serul sanguin a fost obținută prin amestecarea în părți egale a serului cu o soluție de acacia 10% și cu o soluție de acid acetic 10%. Se amestecă întîi acacia cu acidul acetic, iar amestecul se toarnă apoi picătură cu picătură, sub agitare, peste serul sanguin. După 15 minute coacervatul este centrifugat și se analizează electroforetic supernatantul.

Concentrarea soluțiilor proteice a fost făcută prin dializă față de acacia dizolvată în proporție de 50% în soluție izotonică de clorură de sodiu [4]. Volumul soluției de acacia trebuie să fie de aproximativ 10 ori mai mare decît acela al soluției de concentrat.

Denaturarea substanțelor proteice am efectuat-o prin menținerea lor în ultratermostatul Höppler timp de 30 de minute, calculate din momentul în care probele luau temperatura termostatului.

Agaroza a fost preparată după o nouă metodă, rapidă [6]. Gelul de agaroză prezintă față de agar avantajul că, utilizat la imunoelectroforeză și imunodifuzie, permite obținerea unor linii de precipitare mai nete și o separare electroforetică mult mai bună [7] [8]. Utilizarea sa a făcut posibilă efectuarea acestei lucrări, deoarece imunoelectroforeza în gel de agar a supernatantelor rămase de la centrifugarea coacervatelor nu dă rezultate satisfăcătoare.

Antiserul a fost preparat prin hiperimunizarea unor iepuri de aproximativ 2,5 kg cu ser sanguin uman, folosind o schemă de imunizare asemănătoare celei a lui Grabar [9], cu deosebirea că în loc de adjuvantul Freund am utilizat gelul de hidroxid de aluminiu. În prima săptămînă am injectat subcutanat un amestec de 0,5 ml ser uman cu 1,5 ml soluție de clorură de sodiu fiziologică și 2 ml gel ca adjuvant; în a doua săptămînă am făcut o injecție cu 1 ml ser sanguin, în amestec cu 1 ml soluție salină fiziologică și 2 ml adjuvant; în a treia săptămînă am injectat 2 ml ser cu 2 ml adjuvant. În săptămînile 4, 5 și 6 am injectat, tot subcutanat, dar de patru ori pe săptămînă, ser diluat (o parte ser la opt părți soluție fiziologică de clorură de sodiu), fără adjuvant, în următoarele cantități: săptămîna a 4-a cîte 0,5 ml, săptămîna a 5-a cîte 1 ml și săptămîna a 6-a cîte 2 ml. Sîngerarea s-a făcut la 10 zile după ultima injecție.

Imunoelectroforeza a fost efectuată după tehnica lui Scheidegger [10], dar în gel de agaroză [7] în concentrație de 1%. S-a utilizat tamponul veronal-veronal sodic cu pH 8,6 și putere ionică de 0,050 în cuvă și 0,017 în plăci. Tensiunea aplicată a fost de 10 V/cm, iar intensitatea curentului de 0,8 mA/cm. Timpul de migrare, 4 ore. Colorarea plăcilor s-a făcut cu amidoschwarz 10 B.

REZULTAT ȘI DISCUȚII

În figura 1 sînt prezentate imunoelectroforegramele obținute cu: serul normal (*a*), supernatantul rămas după centrifugarea coacervatelor formate cu ser normal (*b*), supernatantul rămas după centrifugarea coacervatelor formate cu ser denaturat la 60° C timp de 30 de minute (*c*) și serul denaturat în aceleași condiții (*d*). Ca ser imun am folosit serul de iepure antiproteine serice umane normale.

În urma coacervării serului normal, linia albuminei apare mult slăbită, în zonele alfa$_1$ și alfa$_2$ rămîne doar cîte o singură linie de precipitare, în zona beta — care, după cum am arătat într-o lucrare anterioară [5], este puțin interesantă în coacervare — se păstrează trei linii, în timp ce imaginea zonei gamma, ale cărei fracțiuni proteice participă de asemenea mai puțin la coacervare, rămîne neschimbată.

Imaginea electroforetică a proteinelor rămase în urma coacervării serului denaturat la 60° C timp de 30 min (fig. 1 *c*) ne arată că față de serul normal se înglobează în coacervat o fracțiune în plus din zona beta. Aceasta este în concordanță cu datele obținute prin electroforeza pe hîrtie, și anume că denaturarea face ca beta-globulinele să devină sensibil mai coacervabile [5]. Faptul că dispariția acestei linii din zona beta se datorește într-adevăr coacervării, și nu termodenaturării proteinelor

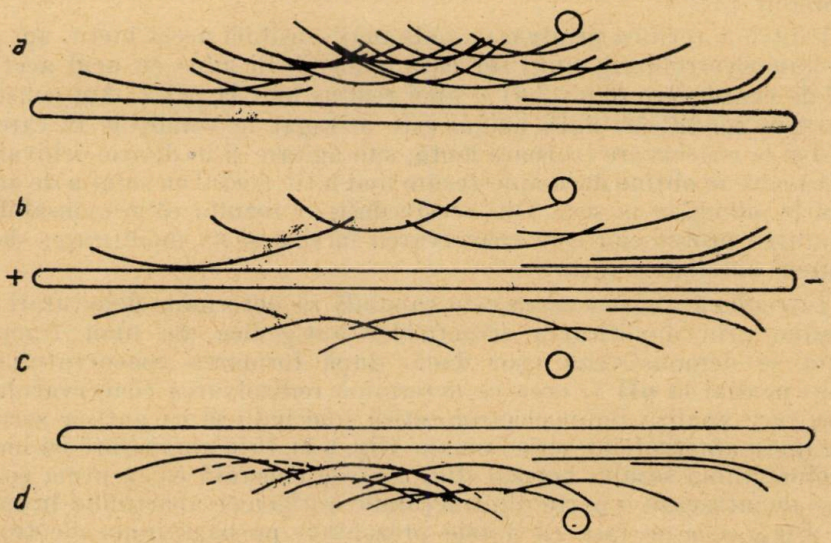


Fig. 1. — Fracțiunile antigenice necoacervabile din serul normal (*b*) și serul denaturat 30 min la 60°C (*c*), comparate cu fracțiunile antigenice ale serului nativ (*a*) și ale celui denaturat (*d*).

antigenice care-i determină apariția, este dovedit prin prezența liniei respective în imaginea imunoelectroforetică a proteinelor serice denaturate în aceleași condiții (fig. 1 *d*).

Întrucît însă liniile de precipitare obținute cu proteinele din supernatantul rămas de la centrifugarea coacervatelor prezentau un aspect oarecum diferit față de cele obținute cu proteinele serice ca atare, ne-am întrebat dacă nu cumva la coacervare se produc unele denaturări, din cauza fie a pH-ului, fie a coacervării însăși. Astfel de denaturări s-ar părea deci că ar avea loc chiar și în mediul de dispersie al coacervatelor, care alcătuiește apoi, după centrifugare, supernatantul. Acest lucru ar fi indicat nu numai de aspectul oarecum modificat al liniilor de precipitare despre care am vorbit mai sus, ci și de faptul că în cursul cercetărilor noastre am constatat că proteinele din acest supernatant sînt foarte sensibile la acțiunea diferiților agenți, ceea ce sugerează că ele ar prezenta deja o denaturare incipientă. Astfel, acest supernatant nu poate fi concentrat prin perevaporare, deoarece, cu toate precauțiile luate, proteinele se denaturează în așa măsură încît imaginea electroforetică se alterează complet, ceea ce nu se întîmplă cu serul diluat și reconcentrat apoi prin această metodă.

Trebuie să arătăm că denaturarea albuminei prin coacervare a fost observată înaintea noastră și de către H.C. Bungemberg de Jong în cazul coacervării cu clupeină [11] și cu acacia [12].

O primă posibilitate ar fi fost aceea ca denaturarea să se datoreze pH-ului la care sînt aduse proteinele pentru coacervare. Această probabilitate este însă infirmată de faptul că acidularea nu influențează treapta polarografică a acestor proteine [3]. De asemenea, nici electroforegrama serului nu se modifică după acidulare și aducere ulterioară la pH 8,2 al tamponului [5].

Pentru a verifica printr-o metodă mai sensibilă acest lucru, am efectuat imunoelectroforeza unui ser care a fost întîi adus cu acid acetic la pH-ul de coacervare (3,5—3,6) și apoi readus lent la pH 7. Am constatat că nu apar modificări dacă acidul este adăugat în condițiile în care am făcut-o și la coacervare (turnare lentă, sub agitare și în diluție echivalentă cu aceea care se obține dacă amestecăm mai întîi acidul cu soluția de acacia și apoi le adăugăm la ser). Din aceste date ar rezulta că responsabilă de denaturarea proteinelor este coacervarea în sine și nu modificarea de pH din cursul acestei operații.

Într-adevăr, coacervarea este capabilă să determine denaturări care se traduc prin modificarea structurilor antigenice ale unor fracțiuni. Aceasta se demonstrează ușor dacă, după formarea coacervatului, se readuce mediul la pH 7, ceea ce determină redizolvarea coacervatului, și apoi se face analiza imunoelectroforetică folosindu-se ca antiser serul de iepure imun antiproteine serice umane (fig. 2 *a*). Prin comparare cu imunoelectroforegrama serului normal (fig. 2 *b*), se constată că în urma coacervării se denaturează o parte din fracțiunile antigenice aparținînd în special zonei $alfa_2$, ceea ce face ca datele prezentate pe baza imunoelectroforegramelor în legătură cu coacervabilitatea fracțiunilor antigenice din această zonă să nu mai prezinte siguranță : dispariția liniilor de precipitare din această zonă, în urma coacervării, are loc prin denaturarea pe care fracțiunile antigenice o suferă în cursul acestui proces, astfel încît testul imunoelectroforetic nu ne mai poate spune dacă ele sînt sau nu înglobate în coacervat. Luînd în considerare însă datele obținute prin electroforeza pe hîrtie [5], care ne indică o coacervare a unei bune părți din $alfa_2$-globuline, și ținînd seama și de faptul că în supernatantul rămas după centrifugarea coacervatului nu dispar în plus alte linii de precipitare în afară de cele care aparțin fracțiunilor ce se denaturează în cursul coacervării, putem considera ca probabilă înglobarea chiar a acestor fracțiuni, ceea ce ar explica și modificarea mai puternică pe care ele o suferă prin coacervare, față de celelalte fracțiuni din aceeași zonă.

Denaturarea pe care proteinele o suferă prin coacervare s-ar putea explica dacă am admite că la coacervare se produc legături mai puternice decît simpla atracție electrostatică, după cum afirma vechea teorie a lui Bungemberg de Jong. Pentru aceasta pledează și lucrările lui A.I. Oparin, M.S. Bardinskaia, S.S. Melik-Sarkisian și K.B. Serebrovskaia [13], efectuate cu albumină serică și acacia, precum și cele ale lui H. Yamane, efectuate cu albumină serică și acizi nucleici pe de o parte [14] și cu ovalbumină și acizi nucleici pe de altă parte [15]. Ei au observat formarea de complexe între componente la coacervare. În cazul nostru, la coacervarea serului sanguin cu acacia am observat de asemenea că după centri-

fugarea coacervatului, în supernatant se menține o opalescență care dispare atunci cînd se ridică sau se scade mai mult pH-ul. În schimb, nici centrifugarea la 12 000 *g* timp de 30 min nu aduce clarificarea lichidului. Atribuim această opalescență formării unor complexe, unor ultramicrocoacervate care nu sînt vizibile la microscopul obișnuit.

Se știe că pentru denaturarea substanțelor proteice este necesar să se producă ruperea punților de hidrogen care stabilizează arhitectura moleculară. Moleculele proteice în soluție formează punți de hidrogen

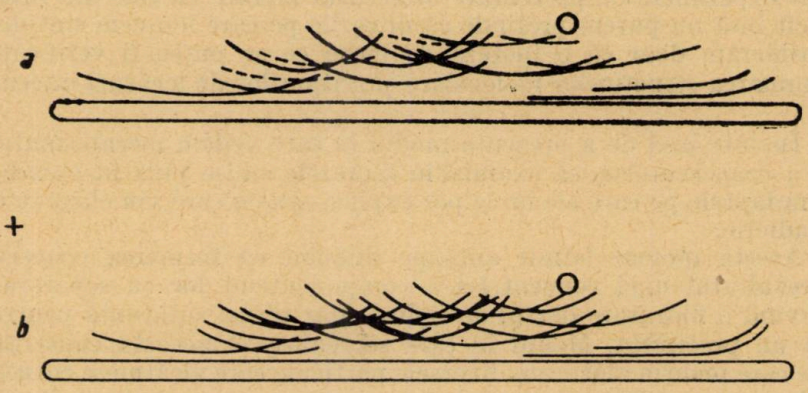


Fig. 2. — Denaturarea proteinelor din ser în urma coacervării : *a*) serul coacervat la PH 3,5, apoi readus la pH 7 ; *b*) serul normal.

cu moleculele de apă. În prezența moleculelor de polizaharid, atunci cînd sarcina electrică nu este de același semn, pentru a ține moleculele la distanță, ar fi posibil să se producă o substituire a punților de hidrogen formate între proteină și apă cu punți între proteină și polizaharid. Aceste legături au o mare energie de interacțiune, ca rezultat al dimensiunii mici a protonului care permite o mai mare apropiere între dipoli [16]. Această apropiere face să intre în acțiune și forțele Van der Waals. Toate aceste interacțiuni ar putea determina deplierea parțială a moleculei proteice, cu ruperea unor punți de hidrogen. Energia liberă care apare s-ar satisface apoi prin formarea unor noi punți de hidrogen cu aceeași moleculă de polizaharid sau, mai probabil, cu alta.

Complexele care am arătat că există și în supernatantul rămas de la centrifugarea coacervatelor ar putea fi un prim stadiu în formarea coacervatelor. Unele fracțiuni proteice ar fi capabile ca printr-o afinitate mai mare față de acacia să grupeze noi molecule, pînă la alcătuirea unei „pături" de acacia de care să se fixeze eventual din nou molecule proteice. Aceste fracțiuni ar forma coacervatele vizibile la microscop, care se depun la centrifugare. Celelalte fracțiuni ar avea o afinitate mai mică față de acacia, formînd eventual doar complexe de dimensiuni mai reduse, care nu se depun. Această situație este mai probabilă decît existența între moleculele proteice din ser, destul de asemănătoare prin proprietăți, a două categorii net distincte : unele cu afinitate mare pentru acacia, avînd tendința de a coacerva cu aceasta și altele lipsite total de o astfel de afinitate, care să nu formeze deci coacervate. Mai degrabă putem privi feno-

menul în modul arătat mai sus, saltul calitativ al coacervării intervenind de la un anumit grad de afinitate pentru acacia, care apare la unele din fracțiuni.

Cercetînd felul în care această afinitate poate fi modificată și factorii care o determină, putem să ne apropiem de mecanismul de formare a coacervatelor, care nu poate fi considerat ca elucidat, fiind foarte controversat. În cele ce urmează, vom căuta să prezentăm punctul nostru de vedere asupra acestui mecanism, așa cum el se conturează din sinteza datelor experimentale prezentate în această lucrare cu cele din literatură. Întrucît însă nu putem pretinde că dovezile pe care le avem sînt decisive, îl considerăm doar ca o ipoteză de lucru ce ar putea fi verificată prin determinarea structurilor moleculare și a tipurilor de legături intermoleculare.

Înainte însă de a prezenta modul în care vedem mecanismul de formare a coacervatelor, să examinăm ipotezele emise pînă în prezent și să arătăm faptele pe care ele nu le pot explica sau cu care vin chiar în directă contradicție.

Aceste ipoteze admit aproape unanim că formarea coacervatelor este rezultatul unei concentrări a componentelor lor cu separarea unei faze avînd o hidratare destul de redusă, dar totuși suficientă pentru a nu forma un precipitat. Modul în care se realizează această concentrare și forțele care mențin alăturate diversele particule care alcătuiesc coacervatul, făcîndu-l nemiscibil cu mediul înconjurător, este explicat în diferite moduri.

Ipoteza cea mai importantă asupra mecanismului formării coacervatelor este cea a lui H. G. Bungemberg de Jong [17—22], reluată și de I. Langmuir [23]. După această ipoteză, formarea coacervatelor este determinată de atracția dintre sarcinile electrice opuse cu care trebuie să fie încărcate micelele componente. Această atracție ar învinge păturile de apă de hidratare individuale, ar apropia micelele unele de celelalte, formîndu-se o manta de hidratare comună. Scăderea forțelor de atracție între particule și moleculele de apă s-ar putea realiza și prin ioni capabili de a neutraliza sarcinile electrice ale particulei.

Acestei ipoteze i s-au adus mai multe critici, dintre care cele mai convingătoare sînt acelea ale lui A. Dobry [24—28], autor care a reușit să obțină coacervate cu coloizi neionizați, cum sînt acelea cu acetat de celuloză în alcool și tetracloroetan sau cu polistirolen în amestec de benzen și hexan. A. Dobry constată că presiunea osmotică în coacervat este extrem de scăzută (de 10—100 ori mai mică decît în soluție), ceea ce nu corespunde cu marea concentrație de substanțe și nu se poate explica prin ipoteza lui H. G. Bungemberg de Jong.

În urma acestor critici, chiar H. G. Bungemberg de Jong a trebuit să-și lărgească ipoteza ([29], citat după [30]). El se bazează pe faptul că aproape toate substanțele capabile de a forma coacervate sînt compuși cu greutate moleculară mare, avînd catene lungi. Ținînd seama de aceasta, el privește coacervatul ca pe un agregat macromolecular, în care buclele pe care le fac catenele reține o mare cantitate de apă, realizîndu-se astfel ceva intermediar între precipitat și soluție coloidă. Ideea aceasta este sprijinită și de unele experiențe [31] asupra soluțiilor de polimeri în solvenți buni și răi. Acești polimeri în solvenți buni au o structură extinsă.

Dacă solventul devine mai puțin bun, sau i se adaugă o cantitate oarecare dintr-un precipitant, atunci structura devine tot mai pliată. Este de așteptat ca, în cursul separării, moleculele pliate să păstreze cantități considerabile de solvent, imobilizate în interiorul „buclelor" formate de catenele lor. Rezultă că o moleculă ce se separă din solventul său în forma extinsă dă naștere unui precipitat, în timp ce o moleculă ce se separă într-o formă pliată dă naștere unui coacervat. După cum se vede, această completare a ipotezei caută să dea seamă și de gradul de hidratare a coacervatelor. În ceea ce privește forțele care determină conglobarea mai multor macromolecule pentru a forma coacervatul, ele nu pot fi în această situație decît forțe de tip Van der Waals.

Mecanismul propus, dacă este aplicabil în unele cazuri, este greu de acceptat pentru coacervatele cu proteine globulare. Acestea, după ultimele cercetări efectuate asupra unor reprezentanți ai lor, sînt pliate compact, reținînd foarte puțină apă în interiorul moleculelor. În consecință, nu se vede cum s-ar mai plia asemenea molecule, cum prin această pliere ar mai cuprinde apă între buclele catenelor polipeptidice și nici cum s-ar forma coacervatul complex cu polizaharidul. În acest fel se explică deci doar coacervarea substanțelor neionizate, admițînd pentru fenomenul coacervării două mecanisme posibile, după substanțele care sînt interesate în acest proces. De asemenea, rămîne mai departe neexplicată presiunea osmotică foarte scăzută din interiorul coacervatelor.

În plus, în prezenta lucrare am mai găsit și alte date experimentale neconcordante cu ipotezele existente. Astfel, albuminele sînt mult mai coacervabile decît beta- și gamma-globulinele chiar la un pH de 3,5 care, fiind mai depărtat de punctul izoelectric al globulinelor decît de acela al albuminelor, anulează diferențele de încărcare electrică în așa măsură, încît la electroforeza pe hîrtie la acest pH, în tampon acid acetic-acetat, ele practic nu se mai separă. Mai mult decît atîta, prin denaturarea termică o parte din albumine își micșorează sarcina electrică, ceea ce duce la omogenizarea electroforetică [32], ele încadrîndu-se în fracțiunea D, cu o mobilitate mai mică. Ar fi fost de așteptat ca în cazul cînd coacervabilitatea ar fi dependentă de sarcinile electrice, această parte denaturată să fie mai puțin coacervabilă ; or, din contră, ea este complet coacervabilă, în timp ce partea din albumine ce-și păstrează mobilitatea electroforetică inițială coacervează într-o măsură cu mult mai mică.

Prin termodenaturare, cu toate că beta-globulinele nu-și modifică încărcarea electrică (cel puțin nu într-o măsură care să afecteze mobilitatea electroforetică), ele devin mult mai coacervabile, fiind fracțiunile proteice care sînt cel mai mult influențate în acest sens prin termodenaturare.

După această scurtă privire asupra principalei ipoteze ce caută să explice mecanismul de formare a coacervatelor și asupra criticilor ce i se aduc, vom formula punctul nostru de vedere asupra acestui mecanism, bazîndu-ne pe date experimentale proprii și din literatură.

Mecanismul de formare a coacervatelor trebuie să dea seama în special de două caracteristici ale acestora, determinate experimental : un conținut relativ ridicat de solvent, păstrînd totuși o nemiscibilitate cu mediul înconjurător și o presiune osmotică extrem de scăzută, în ciuda concentrației mari de substanță. Aceste proprietăți ne fac să ne gîndim

că moleculele participante la formarea coacervatului sînt legate între ele destul de puternic pentru a-și pierde individualitatea, iar prin aceasta masa coacervatică nu este miscibilă cu mediul înconjurător și totodată prezintă și o presiune osmotică foarte mică, ea comportîndu-se practic ca o particulă unitară. Formarea de complexe, ca și denaturările care au loc în cazul coacervatelor cu substanțe proteice, pledează pentru existența unor astfel de legături. Pot fi însă aceste legături exclusiv de tip electrostatic? Desigur că nu. Am arătat în paginile anterioare numeroase argumente împotriva acestui punct de vedere. Pentru a explica apropierea particulelor unele de celelalte, nu este de altfel necesar să apelăm la forțele de atracție dintre particulele cu sarcini diferite. Agitația termică poate produce ciocniri care, în cazul cînd între grupările reacționabile ale respectivelor particule există afinități mai mari decît între particule și solvent, să fie suficiente pentru stabilirea de legături între ele, cu eliminare de solvent. De altfel, pînă cînd nu intervine denaturarea, există în multe cazuri un paralelism între temperatură și cantitatea de substanță ce coacervează. Desigur că atunci cînd sarcinile electrice ale particulelor sînt de același semn, acest lucru se opune apropierii lor la distanțe suficient de mici pentru a se putea stabili legături, iar atunci cînd sînt de semn contrar facilitează formarea unor astfel de legături. Aceasta explică rolul pH-ului în formarea coacervatelor cu substanțe amfotere, cum sînt proteinele.

În ceea ce privește tipul legăturilor care se stabilesc între particule, acestea pot fi foarte diferite, după cum foarte diferite sînt și substanțele care formează coacervate. În cazul coacervatelor proteine-polizaharide, credem că un rol esențial ar reveni punților de hidrogen. Asupra formării acestor punți de hidrogen am discutat mai înainte și de aceea nu vom reveni asupra acestei probleme. În afară de acest tip de legături, se mai pot stabili și alte forme de legături, cum ar fi cele electrovalente și Van der Waals. Prezența unor combinații chimice a fost semnalată în coacervat de A. I. Oparin [33] fără a fi pusă însă în legătură cu mecanismul de formare. În ceea ce privește forțele Van der Waals, despre care vorbește și T. N. Evreinova [34], ele desigur că rezultă ori de cîte ori molecule capabile de astfel de legături se apropie suficient unele de altele. Credem deci că formele de legătură între particulele ce formează coacervatul sînt mult mai diferite decît se considera. Între particule pot acționa unul sau mai multe tipuri de forțe de legare. Condiția formării coacervatului este însă ca aceste forțe să fie mai puternice în unele zone decît forțele de legătură ale particulelor cu solventul, pe care să-l substituie în mare parte și să se stabilească în schimb legături destul de puternice între particule, pentru a se comporta apoi ca un tot și a duce chiar la deformarea macromoleculelor, păstrînd totuși o oarecare laxitate care dă coacervatului unele din proprietățile lichidelor.

CONCLUZII

Cercetările imunochimice au arătat că la coacervare participă în special fracțiunile antigenice din zonele albuminelor, a alfa$_1$- și a alfa$_2$-globulinelor. În urma termodenaturării crește numărul fracțiunilor antigenice interesate în coacervare, incluzînd și o parte din fracțiunile din zona beta-globulinelor.

Prin coacervare are loc totodată și o denaturare a substanțelor proteice, denaturare care se traduce prin modificarea structurii lor antigenice.

Considerăm că la formarea coacervatului se pot stabili mai multe tipuri de legături, cum sînt : punțile de hidrogen, forțele Van der Waals și legăturile electrice. Punțile de hidrogen ar juca un rol deosebit, în special la coacervatele proteoglucidice. Ele explică denaturarea proteinelor prin coacervare.

Forțele Van der Waals iau naștere atunci cînd prin alte legături se realizează o apropiere suficientă între molecule.

Și în ceea ce privește sarcinile electrice apare o deosebire față de ipoteza lui H. G. Bungemberg de Jong. Acesta se referă la rolul sarcinilor electrice micelare în atracția dintre micele ca și în menținerea mantalei de apă. Noi ne referim la stabilirea unor legături electrice între diferite grupări chimice. Astfel de legături joacă probabil un rol important în coacervatele proteinelor cu acizii grași sau cu sărurile cuaternare de amoniu. Prin stabilitatea unor astfel de legături (una sau chiar toate) se realizează o dislocare parțială a apei de hidratare inițiale, realizîndu-se gradul de hidratare caracteristic coacervatului. Legăturile formate sînt suficient de strînse pentru ca particulele să-și piardă individualitatea, ceea ce explică presiunea osmotică redusă din coacervat. Ele nu sînt însă chiar atît de puternice, ca să dea coacervatului o consistență rigidă.

Chiar dacă acest punct de vedere va fi infirmat de cercetările ulterioare, el reprezintă pentru momentul actual avantajul că explică unele fapte în plus față de celelalte ipoteze. Un alt avantaj este acela că deschide perspectivele unor cercetări care să aducă noi date asupra mecanismului de formare a coacervatelor.

Prezentat la redacție la 26 februarie 1966

Institutul de biochimie al Academiei Republicii Socialiste România, București

BIBLIOGRAFIE

1. N. L. Feldman, *Vlianie denaturații belkov na koajervații ih s krasiteleami*, D.A.N. SSSR, **74**, 1139 (1950).
2. E. Macovschi, M. Cârsteanu, *Coacervatul dintre proteinele serului sanguin uman și gumă arabică*, St. cerc. biochim., **2**, 111 (1959).
3. D. Moțet, *Participarea fracțiunilor proteice din serul sanguin uman normal la formarea coacervatelor cu guma arabică*, St. cerc. biochim., **2**, 181 (1959).
4. D. Moțet, *Contribuții la metoda de cercetare a coacervării proteinelor din serul sanguin uman cu guma arabică*, St. cerc. biochim., **3**, 305 (1960).
5. D. Moțet, *Coacervarea fracțiunilor proteice din serul sanguin uman denaturat prin căldură*, St. cerc. biochim., **4**, 257 (1961).
6. V. Gheție, D. Moțet, C. Dragomirescu, *Procedeu rapid pentru prepararea agarozei*, St. cerc. biochim., **8**, 337 (1965).
7. V. Gheție, D. Moțet, *Electroforeza și imunodifuzia proteinelor în gel de agaroză*, St. cerc. biochim., **5**, 409 (1962).
8. S. Brishammar, S. Hjertén, B. Hofsten, *Immunological precipitates in agarose gels*, Biochim. Biophys. Acta, **53**, 518 (1961).
9. P. Grabar, J. Courçon, *Étude de sérums de cheval, lapin, rat et souris par l'analyse immuno-électrophorétique*, Bull. Soc. Chim. Biol., **40**, 1993 (1958).
10. J. J. Scheidegger, *Une microméthode de l'immuno-électrophorèse*, Int. Arch, Allergy, **7**, 103 (1957).

11. H. G. Bungemberg De Jong, W.A.L. Dekker, SianOng Gwan, *Zur Kenntnis der Komplexkoazervation. III. Mitt. Komplex-koazervate unter physiologischen Milieubedingungen*, Biochem. Z., **221**, 392 (1930).
12. H. G. Bungemberg De Jong, Ong Sian Gwan, *Zur Kenntnis der Komplexkoazervation. II. Mitt. Seralbumin+Gummiarabicum*, Biochem. Z., **221**, 182 (1930).
13. A. I. Oparin, M. S. Bardinskaia, S. S. Melik-Sarkisian, K. B. Serebrovskaia, *Nekotorîe dannie o komplexoobrazovanii v sisteme stvorotocinîi albumin-gummiarabic*, D.A.N. SSSR, **108**, 1125 (1960).
14. H. Yamane, *The interaction of nucleic acid and serum albumin*, C.A., 14 846 *i* (1955).
15. H. Yamane, *The interaction of nucleic acid and ovalbumin*, C.A., 14 847 *a* (1955).
16. D. F. Waugh, *Molecular interactions and structure formation in biological systems in macromolecular complexes*, sub redacția M. V. Edds Jr., Ronald Press Comp., N. Y., 1959..
17. H. G. Bungemberg De Jong, H. R. Kruyt, *Koazervation (Entmischung in kolloiden Systemen)*, Koll. Z., **50**, 39 (1930).
18. H. G. Bungemberg De Jong, *Die Koazervation und ihre Bedeutung für die Biologie*, Protoplasma, **15**, 110 (1932).
19. H. G. Bungemberg De Jong, *Koazervation I*, Koll. Z., **79**, 223 (1937).
20. H. G. Bungemberg De Jong, *Koazervation II*, Koll. Z., **79**, 334 (1937).
21. H. G. Bungemberg De Jong, *Koazervation III*, Koll. Z., **80**, 221 (1937).
22. H. G. Bungemberg De Jong, *Koazervation IV*, Koll. Z., **80**, 350 (1937).
23. I. Langmuir, *The role of attractive and repulsive forces in the formation of tactoids, thixotropic gels, protein crystals and coacervates*, J. Chem. Phys., **6**, 873 (1938).
24. A. Dobry, *Coacervation. I. Experimental part*, J. Chim. Phys., **35**, 387 (1938).
25. A. Dobry, *Coacervation. II. Osmotic pressure*, J. Chim. Phys., **36**, 102 (1939).
26. A. Dobry, *Coacervation*, Bull. Soc. Chim. Biol., **22**, 75 (1940).
27. A. Dobry, *Coacervation*, Rev. can. biol., **1**, 353 (1942).
28. A. Dobry, *Coacervation in biology*, Compt, rend., **222**, 693 (1946).
29. H. G. Bungemberg De Jong, în *Colloid Science*, vol. 2, sub redacția H. R. Kruyt, Houdson Elsevier, 1949.
30. Sadhan Basu, Gurucharan Bhattacharya, *Some aspects of the phenomenon of coacervation*, Science, **115**, 544 (1952).
31. T. Alfrey, A. Bartovics, H. Mark, *The effect of temperature and solvent type on the intrinsic viscosity of high polymer solutions*, J. Am. Chem. Soc., **64**, 1557 (1942).
32. D. Moțet, *Modificarea proprietăților antigenice ale proteinelor din serul sanguin uman în urma denaturării termice. II. Cercetări asupra fenomenului de „Omogenizare electroforetică"*, St. cerc. biochim., **8**, 59 (1965).
33. A. I. Oparin, *Originea vieții pe pământ*, Edit. științ., București, 1960.
34. T. N. Evreinova, *Koațervați*, Usp. Sovr. Biol., **37**, 177 (1954).

ST. CERC. BIOCHIM., 9, 3, 299–303 (1966)

EXOSMOZA SUBSTANȚELOR REDUCĂTOARE ÎN DIFERITE STĂRI FUNCȚIONALE ALE MUȘCHIULUI (NOTĂ PRELIMINARĂ)

LORA SCOLNIC

611.018.62 : 577.25

Rezumat. — S-a urmărit exosmoza substanțelor reducătoare din mușchiul gastrocnemian de broască în excitație, contracție cu travaliu și denervare. Excitația electrică, precum și denervarea cu sacrificare imediată, conduc la o creștere a substanțelor reducătoare exosmozate. Această creștere poate fi rezultatul unei intensificări a activității metabolice manifestată prin mărirea gradientului hidraților de carbon, unei creșteri a permeabilității membranei musculare sau ambelor fenomene. În contracția cu travaliu, ca și în denervare și sacrificare după 24 de ore, nu se obțin valori modificate ale substanțelor reducătoare difuzate.

Se știe că activitatea musculară este legată de o metabolizare mai accentuată a glucidelor. Nu este exclus ca substanțele reducătoare produse în cursul acestui proces, să poată ieși din mușchi. Este însă interesant că pe cînd endosmoza zaharurilor în mușchi a format obiectul a numeroase lucrări, printre care cele ale lui E. Helmerich și C. F. Cori [1], G. H. Bunyatyan [2], R. R. Candela și colab. [3], Pinor Özand și colab. [4], B. Bhattachary [5] și altele, problema exosmozei din mușchi a acestor substanțe se pare că nu a fost încă abordată ; în literatura care mi-a fost accesibilă, nu am găsit lucrări de acest gen.

Deoarece prin fenomenul exosmozei se poate cerceta evoluția proceselor biochimice în diferite țesuturi și organe [6] [7] [8] și caracteriza starea funcțională a acestora [9] [10], ni s-a părut util să cercetăm exosmoza substanțelor reducătoare în excitare, contracție cu travaliu și denervare.

MATERIAL ȘI METODE

S-a lucrat pe broaște (*Rana ridibunda*) capturate în jurul Bucureștiului în perioada aprilie—octombrie 1965. Experiențele s-au efectuat pe mușchiul gastrocnemian *in situ*, la temperatura laboratorului, broasca fiind fixată pe o placă de lemn, prin legături elastice [11], cu 10 min înainte de experiență. S-a evitat vreo acțiune prealabilă asupra animalului, aptă să influențeze biochimismul muscular, ca : anestezia, răcirea, decapitarea, distrugerea măduvei spinării etc. Picioarele posterioare erau tăiate simultan, iar mușchii, izolați fără lezare, erau introduși cît mai repede posibil în 7 ml soluție salină preparată după L. Jendrassik [12], conținînd la un litru : NaCl 6,5 g, KCl 0,2 g, $CaCl_2$ 0,2 g, $NaHCO_3$ 0,1 g. După o extracție de două ore la temperatura camerei (22°C ± 2° C), în condiții de aerare, se luau 2,5 ml extract și se dozau substanțele reducătoare după metoda Hagedorn-Jensen [13]. Rezultatele se exprimau în ml tiosulfat de sodiu N/200 întrebuințați.

Excitarea electrică a mușchiului *in situ* s-a făcut prin intermediul unui generator de impulsuri, electrozii nepolarizabili de argint clorurat fixîndu-se la extremitățile mușchiului gastrocnemian. Excitarea s-a aplicat timp de 3 min, cu un curent de 2,2 mA, 120 imp/min, durata unei excitații 5 ms. Contracția cu travaliu s-a realizat prin legarea unei greutăți de piciorul posterior al broaștei, la nivelul tendonului mușchiului supus unei excitări electrice. Denervarea s-a obținut prin secționarea nervului sciatic de la unul din picioarele posterioare, celălalt picior servind drept martor.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Înainte de a trece la determinările propriu-zise, am urmărit pe un lot de 10 broaște normale puterea reducătoare a substanțelor exosmozate din mușchii gastrocnemieni simetrici ai aceluiași animal. Din datele obținute se constată că cei doi mușchi simetrici, aflați în prealabil în repaus, lasă să difuzeze în soluția salină înconjurătoare, în timpuri egale, cantități aproape egale de substanțe reducătoare, ceea ce face ca raportul R între intensitatea exosmozei din mușchiul stîng și aceea din mușchiul drept să varieze între 0,96 și 1,09. Acest fapt ne-a permis să studiem, pe aceeași broască, efectul tratamentului aplicat. În schimb, cantitățile de substanțe reducătoare care ies prin exosmoză din mușchii diferitelor broaște, variază în limite destul de mari de la animal la animal — între 0,37 și 0,97 — ceea ce arată rolul important al factorului individual.

Influența exercitată de excitarea electrică s-a cercetat în două serii de experiențe. În prima serie mușchiul martor a fost denervat înainte cu 24 de ore, iar în a doua el n-a fost prealabil tratat. Din rezultatele obținute reiese că, în ambele cazuri, la mușchii excitați substanțele reducătoare exosmozate au crescut considerabil. În tabela 1 sînt expuse, spre exemplificare, datele primei serii de experiențe.

Era interesant de urmărit comportarea mușchiului în contracția cu travaliu, față de mușchiul în repaus. În acest scop, mușchiul gastrocnemian tensionat *in situ*, prin legarea la partea de jos a unei greutăți de 20 g, a fost supus excitației electrice directe (3 min, 2,2 mA, 120 imp/ /min, durata 5 ms). După excitare s-au tăiat simultan ambele picioare, iar cei doi mușchi au fost introduși în soluție Ringer-Jendrassik [12], în vederea determinării capacității de reducere a substanțelor difuzate. Din tabela 2, coloana *A*, se observă că mușchiul care a efectuat contracție cu travaliu lasă să difuzeze în soluția salină înconjurătoare o cantitate mărită de substanțe reducătoare, față de mușchiul în repaus. Deoarece raportul volumelor de tiosulfat de sodiu întrebuințate la dozarea substanțelor exosmozate din mușchiul în contracția cu travaliu față de cele întrebuințate la mușchiul martor variază, ca și în cazul excitației, în limite destul de largi — de la 1,18 pînă la 3,57 — și, pentru a stabili dacă valorile ridicate se datoresc travaliului și nu excitației, am urmărit influența travaliului în cazul în care ambii mușchi primesc aceeași excitație electrică.

În acest scop, era necesar să stabilim în prealabil comportarea celor doi mușchi simetrici supuși *in situ* unei excitări concomitente identice. Datele obținute arată, după cum era de așteptat, o concordanță satisfăcătoare, valorile capacității de reducere variind — datorită diferențelor individuale mai sus-semnalate — între 0,18 și 1,12, iar raportul R între 0,87 și 1,10. Urmărirea exosmozei substanțelor reducătoare din mușchiul

Tabela 1

Capacitatea de reducere a substanțelor difuzate într-o soluție salină din mușchiul gastrocnemian de broască excitată (3 min, 2,2 mA, 120 imp/min, durata 5 ms), exprimată în ml tiosulfat de sodiu N/200 întrebuințați. Mușchiul martor denervat cu 24 de ore înainte de experiență.

Mușchi martor = m
Mușchi excitat = e
$R = \frac{e}{m}$

m	e	R
0,49	0,73	1,49
0,26	0,41	1,57
0,15	0,28	1,86
0,17	0,29	1,70
0,48	0,70	1,45
0,14	0,22	1,57
0,22	0,41	1,86
0,15	0,38	2,53
0,11	0,32	2,90
0,09	0,26	2,88
Media :0,22	0,40	1,98

$D_{exp.} = 0,18$
$F_{0,05} = 4,41$
$F_{0,01} = 8,28$
$F_{exp.} = 12,58$
$D_{0,05} = 0,007$

Tabela 2

Capacitatea de reducere a substanțelor exosmozate într-o soluție salină din mușchiul gastrocnemian de broască în contracția cu travaliu (3 min, 2,2 mA, 120 imp/min, durata 5 ms), exprimată în ml tiosulfat de sodiu N/200 întrebuințați.

Greutate fixată la mușchi = G
Mușchi martor = m
Mușchi în travaliu = t
$R = \frac{t}{m}$

A Mușchiul martor în repaus $G = 20$ g			*B* Mușchiul martor în contracție simplă $G = 50$ g		
m	t	R	m	t	R
0,33	1,18	3,57	0,38	0,39	1,02
0,13	0,29	2,23	0,40	0,45	1,12
1,25	1,50	1,20	0,71	0,75	1,05
0,39	0,48	1,23	0,74	0,89	1,20
0,32	0,47	1,46	0,74	0,78	1,05
0,98	1,16	1,18	0,38	0,40	1,03
0,40	0,57	1,42	0,29	0,30	1,00
0,50	1,20	2,40	0,73	0,69	0,94
0,50	0,72	1,44	0,77	0,82	1,06
0,20	0,35	1,75	0,42	0,42	1,00
Media : 0,50	0,79	1,78	0,55	0,58	1,04

$D_{exp.} = 0,29$
$F_{0,05} = 4,41$
$F_{0,01} = 8,28$
$F_{exp.} = 20,61$
$D_{0,05} = 0,03$

$F_{0,05} = 4,41$
$F_{0,01} = 8,28$
$F_{exp.} = 0,05$

supus contracţiei cu travaliu, faţă de muşchiul supus contracţiei simple (fără travaliu), s-a făcut atît în cazul în care la laba piciorului broaştei s-a atîrnat o greutate de 20 g, ca şi de 50 g. Indiferent de greutate, rezultatele arată (tabela 2, coloana *B*) că substanţele reducătoare care

Tabela 3

Capacitatea de reducere a substanţelor exosmozate într-o soluţie salină din muşchiul gastrocnemian de broască denervat şi sacrificată imediat, exprimată în ml tiosulfat de sodiu N/200 întrebuinţaţi.

Muşchi martor = m
Muşchi denervat = d
$R = \frac{d}{m}$

m	d	R
0,33	0,42	1,27
0,26	0,46	1,76
0,15	0,18	1,20
0,27	0,46	1,70
0,33	0,56	1,70
0,31	0,39	1,25
0,34	0,54	1,58
0,65	0,85	1,30
0,25	0,49	1,96
0,28	0,37	1,32
Media : 0,31	0,47	1,50

$D_{exp.} = 0,155$
$F_{0,05} = 4,41$
$F_{0,01} = 8,28$
$F_{exp.} = 25,6$
$D_{0,05} = 0,002$

difuzează din muşchiul care se contractă cu travaliu sînt aproape egale cu cele exosmozate din muşchiul care se contractă fără travaliu. Rezultă că, în condiţiile noastre experimentale, substanţele reducătoare care ies prin exosmoză din muşchiul care execută o contracţie cu travaliu nu arată valori modificate faţă de muşchiul în contracţia simplă (fără travaliu).

În experienţele legate de cel de-al treilea obiectiv al lucrării de faţă, şi anume efectul denervării muşchiului gastrocnemian asupra exosmozei substanţelor reducătoare, aceasta s-a urmărit în două variante : în prima, tăierea picioarelor s-a făcut imediat după secţionarea nervului sciatic, iar în a doua variantă după 24 de ore de la intervenţie. În primul caz (tabela 3), efectul denervării este similar cu al excitaţiei electrice, muşchiul denervat lăsînd să difuzeze cantităţi crescute de substanţe reducătoare. În cea de a doua variantă, experienţele efectuate pe acelaşi număr de broaşte arată că la ambii muşchi exosmoza substanţelor reducătoare este aproape egală. Valorile au fost cuprinse între 0,12 şi 0,81 ml tiosulfat de sodiu N/200, raportul R a variat între 0,90 şi 1,10 şi calculul statistic a arătat : $F_{0,05} = 4,41$, $F_{0,01} = 8,28$, $F_{exp} = 0,25$.

În concluzie, rezultă că excitaţiei electrice aplicate muşchiului gastrocnemian de broască *in situ*, ca şi denervării şi sacrificării imediate, îi

corespunde o creștere a exosmozei substanțelor reducătoare, care poate fi rezultatul unei intensificări a activității metabolice manifestată prin mărirea gradientului hidraților de carbon, unei creșteri a permeabilității membranei musculare, sau ambelor procese. În contracția cu travaliu, ca și în denervare și sacrificare după 24 de ore, nu se obțin valori modificate ale substanțelor reducătoare difuzate, față de mușchiul martor. Rămîne ca lucrări viitoare să elucideze natura substanțelor reducătoare implicate în aceste modificări.

Prezentat la redacție la 30 martie 1966

Institutul de biochimie al Academiei Republicii Socialiste România, București

BIBLIOGRAFIE

1. E. Helmreich, C. F. Cori, *Studies of tissue permeability. The distribution of pentoses between plasma and muscle*, J. Biol. Chem., **224**, 663 (1957).
2. G. H. Bunyatyan, *Novie danie o poli gama-aminomaslianoi kisloti*, D.A.N. SSSR, **132**, 1431 (1960).
3. R. R. Candela, M. Rodriguez Lopez, T. Castilla-Cortazar, J. L. R. Candela, *Correlation of the effects of insulin and of muscular contraction in vitro on uptake of glucose by the frog*, Nature, **195**, 712 (1962).
4. Pinor Özand, H. T. Narahara, C. F. Cori, *The effect of anaerobiosis on glucose uptake in frog sartorius muscle*, J. Biol. Chem., **237**, 3037 (1962).
5. G. Bhattacharya, *Effects of metal ions on the utilization of glucose and on the influence of insulin on it by the isolated rat diaphragm*, Biochem. J., **79**, 369 (1961).
6. E. Macovschi, *Exosmoza ca mijloc de cercetare a evoluției proceselor biochimice în semințele plantelor de cultură și rolul ei în stimularea și germinarea acestor semințe*, Com. Acad. R.P.R., **V**, 1171 (1955).
7. E. Macovschi, V. Panaitide, *Exosmoza fosforului anorganic din semințele grîului de toamnă A_{15} în cursul iarovizării*, Com. Acad. R.P.R., **V**, 811 (1955).
8. E. Macovschi, O. Zaharia, N. Moldoveanu, *Evoluția glutenului și a ionilor de amoniu ca aspecte ale metabolismului proteic din semințele grîului de toamnă A_{15} supuse iarovizării*, Bul. St. Acad. R.P.R., **VII**, 199 (1955).
9. E. Macovschi, S. Comoroșan, *Cercetări conductometrice asupra exosmozei electroliților din piele*, St. cerc. chimie, **IV**, 271 (1956).
10. E. Macovschi, T. Rădulescu, L. Scolnic, *Exosmoza fosforului anorganic ca test al stării mușchiului*, St. cerc. biochim., **5**, 485 (1962).
11. E. Macovschi, C. Iordache, C. Dragomirescu, *Fosfagenul în diferite stări de excitabilitate musculară*, St. cerc. biochim., **4**, 171 (1961).
12. L. Jendrassik, I. Faiszt, *Die ersten chemischen Prozesse der Muskelkontraktion*, Ann. Sci., Budapest, Rolando Eötvös nom. Sect. Biol., **1**, 133 (1957).
13. I. Manta, A. Ciplea, *Metodele laboratorului clinic*, Edit. medicală, București, 1947, p. 121.

ST. CERC. BIOCHIM., 9, 3, 305–309 (1966)

ASPECTE ALE METABOLISMULUI METIONINEI-^{35}S ÎN ENTEROPATII

I. SZÁNTAY şi D. DUMITRAŞCU

577.1

Rezumat. — S-a urmărit metabolismul metioninei-^{35}S, administrată per oral la bolnavi cu enteropatii, prin determinarea eliminării urinare globale de ^{35}S timp de 72 de ore, prin analiza radiocromatografică cantitativă şi calitativă a aminoacizilor şi aminelor-^{35}S extrase din urina de 24 şi 48 de ore, precum şi prin separarea şi identificarea radiocromatografică a fracţiunilor de sulfaţi liberi şi esterificaţi şi de cetotioacizi.

S-a stabilit radiometric o creştere a eliminării globale de ^{35}S, în special în primele 24 de ore, precum şi o creştere a fracţiunii aminoacizilor şi aminelor-^{35}S. Analiza radiocromatografică a arătat că fracţiunea principală este reprezentată de taurina-^{35}S, metionina-^{35}S nemetabolizată fiind în cantitate redusă sau chiar absentă. Se discută semnificaţia creşterii vitezei de metabolizare a metioninei, pusă în evidenţă, precum şi implicaţiile posibile, în legătură cu aspectele specifice ale bolii studiate.

Metabolismul metioninei în enteropatii a fost pînă în prezent puţin cercetat. Lévy şi colab. [7] au arătat că după administrare per orală de metionină-^{35}S, eliminarea de ^{35}S prin fecale creşte. Fodor şi colab. [2][3] au fracţionat metaboliţii sulfuraţi ai metioninei-^{35}S, eliminaţi prin fecale, cu ajutorul răşinilor schimbătoare de ioni, şi i-au determinat calitativ şi cantitativ. Pe de altă parte, studiul metabolismului metioninei în diverse alte afecţiuni [10–13] a pus în evidenţă o serie de modificări, dintre care unele specifice bolii respective, iar altele comune pentru toate bolile studiate.

Avînd în vedere că metabolismul metioninei la bolnavii cu enteropatii este încă insuficient precizat, ne-am propus studiul anumitor aspecte ale acestuia, cu ajutorul metioninei-^{35}S administrate per oral şi absorbite pe cale digestivă. Rezultatele sînt discutate în corelaţie cu unele date obţinute anterior, după administrarea intravenoasă a substanţei.

MATERIAL ŞI METODE

Au fost cercetaţi 23 de bolnavi cu enteropatii nespecifice de origine diferită (dischinezie, aclorhidrie, stomac operat), indemni din punct de vedere hepatic. Rezultatele obţinute la aceşti bolnavi s-au raportat la un lot de persoane sănătoase (date publicate într-o lucrare anterioară [3]).

Ambele loturi au primit pe cale orală, dimineaţa pe stomacul gol, metionină-^{35}S, în doză de 2 μCi/kg corp. Eliminarea urinară globală de ^{35}S s-a determinat timp de 72 de ore, iar rezultatele s-au exprimat în procente faţă de doza administrată. Din urina de 24 de ore s-au extras aminoacizii şi aminele-^{35}S cu Amberlit IR 120. Extractul obţinut a fost analizat radiometric şi radiocromatografic. Valorile obţinute prin determinările radiometrice şi prin fotometrarea radiocromatogramelor au fost exprimate în procente faţă de doza administrată. Avînd în vedere că fracţiunea aminoacidică şi aminică-^{35}S reprezintă doar aproximativ 30 % din eliminarea urinară globală de ^{35}S, s-au extras din urină, cu Amberlit IRA 400, şi sulfaţii liberi şi esterificaţi, precum şi cetotioacizii (în mediu acid, respectiv în mediu alcalin). Separarea şi identificarea acestor fracţiuni s-a efectuat cu ajutorul metodei radiocromatografice.

REZULTATE

Valorile eliminării urinare globale de ^{35}S, precum şi ale fracţiunii aminoacidice şi aminice-^{35}S per 72 ore, sînt prezentate în tabela 1.

Aşa cum reiese din aceste date, valorile eliminării sînt crescute faţă de martori, fapt deosebit de interesant dacă ţinem seama că acest grup de bolnavi prezenta tulburări de absorbţie (eliminarea fecală de ^{35}S este de $12 \pm 6\%$ faţă de $4 \pm 2\%$ la martori). Modificările cele mai ample ale eliminării urinare de ^{35}S se observă în primele 24 de ore. Determinarea radiometrică a aminoacizilor şi aminelor-^{35}S din urină arată o creştere netă faţă de martori.

Radiocromatogramele aminoacizilor şi aminelor ^{35}S extrase din urină sînt prezentate în figurile 1 şi 2.

Examinînd aceste radiocromatograme, se constată că fracţiunea principală este reprezentată de taurina-^{35}S; metionina-^{35}S se află în cantitate redusă, iar în unele cazuri lipseşte cu desăvîrşire. Pe de altă parte, aspectul general al radiocromatogramelor se deosebeşte cu totul de acela al radiocromatogramelor obţinute din extractele urinare ale indivizilor sănătoşi (fig. 3).

Rezultatele obţinute prin fotometrarea radiocromatogramelor sînt prezentate în tabela 2.

Din aceste date reiese că la bolnavii de enteropatii, cea mai mare parte a fracţiunii aminoacidice şi aminice-^{35}S urinare este constituită din taurină şi nu corespunde unei eliminări de metionină nemetabolizată. În figura 4 este redată radiocromatograma fracţiunii urinare extrase în mediu acid, iar în figura 5 aceea a fracţiunii urinare extrase în mediu alcalin. Din prima porţiune s-a identificat doar sulfatul liber, din a doua fracţiune acidul γ-metil-β-cetotiobutiric.

DISCUŢII

Înainte de a trece la interpretarea rezultatelor, trebuie subliniat faptul că toţi compuşii ^{35}S urinari provin din metabolizarea metioninei-^{35}S administrată peroral şi absorbită pe cale digestivă.

Determinările radiometrice în sînge şi fecale [1][2] au arătat că absorbţia metioninei a fost deficitară ; cu toate acestea, eliminarea urinară de ^{35}S este paradoxal crescută. Analiza acestei radioactivităţi arată însă că este doar o contradicţie aparentă ; într-adevăr, creşterea se datoreşte nu metioninei-^{35}S nemetabolizate, ci metaboliţilor ei. Mai mult, eliminarea de metionină nemetabolizată este sub nivelul fiziologic, indicînd existenţa unei hipermetabolizări. În acelaşi sens pledează şi creşterea eliminării

Tabela 1

Valorile eliminării urinare globale de ^{35}S și ale eliminării fracțiunilor aminoacidice și aminice ^{35}S, determinate timp de 72 de ore la bolnavi cu enteropatii și la martori normali. Rezultatele sînt exprimate în procente față de doza administrată

	Eliminare de ^{35}S total (%)				Eliminare aminoacizi și amine ^{35}S %			
	24	48	72	global	24	48	72	global
Enteropatii (23 cazuri)	31,1±9	5,4±2,1	3,0±1,1	39,5±12,5	12,6±3,4	1,2±0,9	0,3±0,2	14,1±3,8
Normali (16)	14,6±4,7	2,1±0,6	1,2±0,5	17,9±5,3	5,4±2,6	0,6±0,3	0,2±0,09	6,2±3,4

Tabela 2

Valorile eliminării urinare de metionină-^{35}S și taurină-^{35}S, determinate radiocromatografic din urina de 24 de ore, la bolnavi cu enteropatii și la martori normali. Rezultatele sînt exprimate în procente față de doza administrată

	Taurina- ^{35}S (%)	Metionina- ^{35}S(%)	Taurină/Metionină
Enteropatii (23 cazuri)	10,27±2,07	1,48±1,25	6,94
Normali (16)	2,96±1,45	2,31±1,05	2,31

de metaboliţi sulfuraţi ^{35}S. Creşterea vitezei de metabolizare a metioninei, concomitentă cu mobilizarea rezervelor de metionină ale organismului (manifestată prin eliminare urinară scăzută), a fost observată şi la bolnavii cu ulcer duodenal în faza activă [1], ambele fenomene normalizîndu-se în perioada de acalmie.

Trebuie subliniat că atît bolnavii cu ulcer duodenal cît şi cei cu enteropatii prezentau o funcţie hepatică nealterată. Dimpotrivă, bolnavii cu hepatită epidemică sau cronică [4][13] prezintă o creştere apreciabilă de metionină-^{35}S nemetabolizată, ceea ce indică în mod cert alterarea funcţiunii hepatice.

Accelerarea vitezei de metabolizare a metioninei în enteropatii poate fi pusă pe seama creşterii volumului reacţiilor de transmetilare, fapt indicat de creşterea eliminării urinare de taurină precum şi de ^{35}S global, aparţinînd în mare parte sulfaţilor liberi şi esterificaţi.

Pe de altă parte, analiza stării generale a bolnavilor cercetaţi evidenţiază, în aproape toate cazurile, prezenţa — în grade variate — a sindromului de denutriţie. Apare deci că, alături de alte procese răspunzătoare de apariţia denutriţiei (maldigestie, malabsorbţie, exsudaţie proteică etc.) intervine şi un fenomen de hipercatabolism, pus în evidenţă de noi în cazul metioninei. Ar fi de aşteptat deci ca această hipercatabolizare să ducă la o carenţă temporară în metionină. Într-adevăr, Müting [8] şi Christ [1] au arătat la bolnavi cu afecţiuni hepatice prezentînd tulburări ale metabolismului metioninei, o scădere a conţinutului în metionină al proteinelor. Un fenomen similar a fost observat de Fodor şi Szántay [6] în intoxicaţii cu tetraclorură de carbon la iepuri, unde s-a găsit un conţinut în metionină scăzut în proteinele organelor parenchimatoase şi în cele serice. Paralel, s-a constatat o hipercatabolizare a metioninei, precum şi o eliminare caracteristică de metionină nemetabolizată.

În aceeaşi ordine de idei trebuie citate lucrările lui Sós [9] şi Varga [14], care au arătat că la animalele hrănite cu un regim fără metionină apar tulburări grave ale metabolismului proteic. Tot astfel, în cazul bolnavilor cu enteropatii ar fi posibil deci ca creşterea vitezei de metabolizare a metioninei să antreneze anumite tulburări ale metabolismului proteic, răspunzătoare într-o măsură oarecare de apariţia denutriţiei.

Totodată, acest fenomen poate constitui o reacţie de adaptare a organismului, mărirea volumului reacţiilor de transmetilare a metioninei reprezentînd efortul organismului de a asigura necesarul energetic crescut, impus de starea de suprasolicitare cauzată de boală. Adîncirea acestor aspecte formează obiectul preocupărilor noastre actuale.

CONCLUZII

Bolnavii cu enteropatii prezintă o intensificare a metabolizării metioninei, exprimată prin creşterea eliminării urinare de metaboliţi sulfuraţi ^{35}S şi prin scăderea, sub nivelul fiziologic, a eliminării de metionină-^{35}S nemetabolizată. Acest fenomen de hipercatabolism poate fi răspunzător de apariţia denutriţiei, dar poate constitui şi reacţia de adaptare a organismului faţă de starea de suprasolicitare cauzată de boală.

Prezentat la redacţie la 23 Februarie 1966 *I.M.F., Cluj Clinica a III-a medicală*

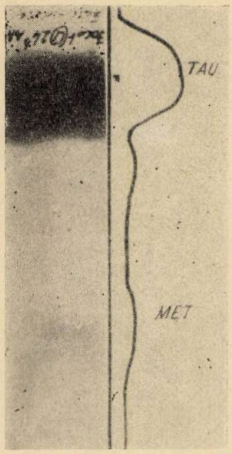


Fig. 1. — Autoradiocromatogramă obţinută din urina de 24 de ore extrasă cu Amberlit IR 120 la bolnavi cu enteropatii. Sînt prezente taurina-^{35}S şi metionina-^{35}S.

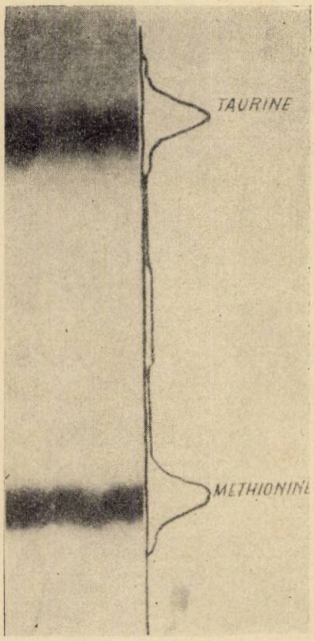


Fig. 3. — Autoradiocromatogramă obţinută din urina de 24 de ore extrasă cu Amberlit IR 120 la indivizi normali. Sînt prezente taurina-^{35}S şi metionina-^{35}S.

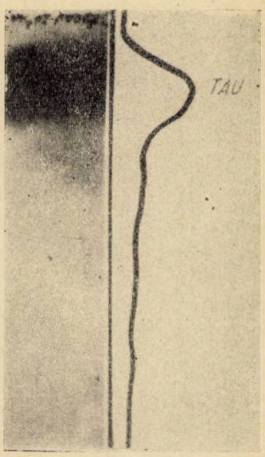
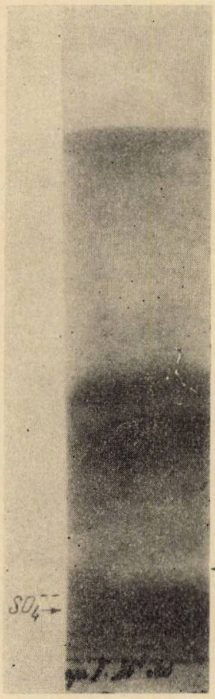


Fig. 2. — Autoradiocromatogramă obţinută din urina de 24 de ore extrasă cu Amberlit IR 120 la bolnavi cu enteropatii. Este prezentă numai taurina-^{35}S.



← Fig. 4. — Autoradiocromatogramă obţinută din urina de 24 de ore extrasă în mediu acid cu Amberlit IRA 400. Sînt prezenţi sulfaţii esterificaţi şi liberi.

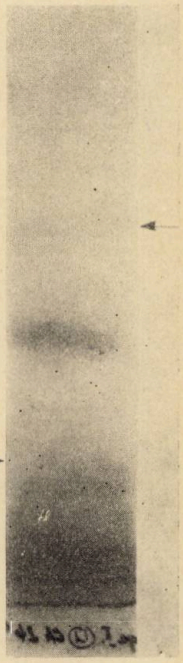


Fig. 5. — Autoradiocromatogramă obţinută din urina de 24 de ore extrasă în mediu alcalin cu Amberlit IRA 400. Sînt prezenţi cetotioacizii. Fracţiunea indicată cu săgeată corespunde acidului γ-metil-β-cetotiobutiric. →

BIBLIOGRAFIE

1. B. Christ, *Gezielte Methionintherapie*, Zschr. inn. Med., **9**, 143 (1954).
2. O. Fodor, *Darmsiedlung und Verdanungsstörungen*, în Symposion der Microecologie, Berlin, sept, 1964.
3. O. Fodor, D. Dumitrescu, I. Szántay, N. Pîrîu, *Beiträge zur Kenntnis der Absorptionsstörungen bei chronischen Enteropathien mit bakterieller Darmsiedlung*, Congr. Nat. Med. Int. Ung., 1965.
4. O. Fodor, P. Surianu, S. Tralyor, S. Cotul, I. Szántay, T. Holan, M. Fărcășanu, *Noi verificări clinice și biochimice cu privire la acțiunea terapeutică a acidului aspartic în hepatitele cronice*, Med. Int. București, **XV**, 463 (1963).
5. O. Fodor, S. Cotul, I. Szántay, M. Fărcășanu, R. Abrudan, *Le comportement des métabolites sulfurés urinaires de la méthionine dans l'ulcère duodénal et gastrique*, Congr. de Gastroentérologie, Bruxelles, 1964.
6. O. Fodor, I. Szántay, *L'application thérapeutique de l'acide aspartique dans l'hépatite chronique*, Congr, de Med. Int., Buenos Aires, nov. 1964.
7. S. H. Levy, D. I. Sandweiss, R. A. Gagliardi, H. Y, Feigelsohn, *Proc. World Congr. Gastroenterology, Washington*, 1958, p. 445
8. P. Műting, *Methionine*, Zschr. inn. Med., **12**, 1107 (1957).
9. I. So, *Szervezete Károsodások alimentaris tényezöi*, Magy. Tud. Akad. Biol. Orv. Tud. Kőzl., **XIII**, 41 (1962).
10. I. Szántay, M. Fărcășanu, O. Fodor, S. Cotul, *Action de l'acide aspartique sur le métabolisme de la méthionine-^{35}S dans l'hépatite chronique*, Rev. Int. Hémat. **XII**, 429 (1963).
11. I. Szántay, T. Holan, O. Fodor, S. Cotul, *Unele aspecte biochimice ale metabolismului metioninei în ulcerul duodenal și gastric*, St. cerc. biochim., **7**, 417 (1964).
12. I. Szántay, T. Holan, M. Fărcășanu, R. Abrudan, M. Gidoli, I. Anesciuc, I. Gavrilă, *Recherches concernant certaines modifications métaboliques de la méthionine dans l'hépatite épidémique*, Rev. Int. Hémat., **XIV**, 655 (1964).
13. I. Szántay, T. Holan, *Considerații metodologice privitoare la metabolismul metioninei-^{35}S în diverse stări patologice*, Congresul de radiologie, București, sept. 1964.
14. P. Varga, I. Decsi, I. Csalay, *Veränderungen im Leberstoffwechsel von Ratten unter Methioninmangeldiät*, Acta Physiol. Acad. Sci. Hung., **XVII**, 93 (1960).

ST. CERC. BIOCHIM., 9, 3, 311–323 (1966)

REFERAT GENERAL

SINTEZA PROTEINELOR DE REZERVĂ ÎN CURSUL COACERII SEMINȚELOR

VICTOR GHEȚIE

545.845

După ce s-a produs dubla fecundație, evoluția caracterului proteic al zigotului este determinată, în primul rînd, de dezvoltarea ulterioară a endospermului [1].

La plantele ale căror semințe își dezvoltă continuu endospermul în procesul de embriogeneză, procesul predominant este sinteza proteinelor de rezervă și el determină acumularea lor în endosperm la sfîrșitul coacerii (de ex. gramineele). La alte plante, dezvoltarea endospermului se oprește la o anumită fază a embriogenezei, după care această formațiune este resorbită treptat și dispare. În acest proces, proteinele endospermului sînt hidrolizate, iar aminoacizii și dipeptidele rezultate sînt transportați la nivelul cotiledoanelor embrionului, unde are loc sinteza și acumularea proteinelor de rezervă (de ex. leguminoasele).

Din aceste motive, evoluția sintezei proteice în cursul coacerii semințelor trebuie cercetată nu pe sămînța integrală, așa cum a procedat majoritatea autorilor, ci separat, pe formațiunile care o compun. La disocierea seminței în părțile ei componente, trebuie folosit mai puțin criteriul morfologic și mai mult cel funcțional. Astfel, la graminee, sinteza proteinelor trebuie urmărită separat, atît pe endosperm cît și pe embrion, ultimul luat fără scutelum, în timp ce la leguminoase embrionul trebuie disociat la rîndul său în părțile de creștere, care participă direct în procesul de morfogeneză (axul embrionar), și cele cu rol de rezervă (cotiledoanele).

1. — PROTEINE DE REZERVĂ ȘI PROTEINE PROTOPLASMATICE

Delimitarea diferitelor formațiuni din sămînță după criteriul funcțional ne permite să încercăm și o delimitare corespondentă a tipurilor de proteine care intră în alcătuirea lor.

La graminee, puținele date pe care le furnizează literatura par să arate că proteinele de rezervă (prolaminele) sînt localizate numai în endosperm, embrionul fiind liber de prolamine [2]. Caracterul proteic diferit al acestor două formațiuni ar putea fi o consecință a originii și masei lor ereditare diferite; astfel, embrionul este diploid și provine din dezvoltarea zigotului principal, iar endospermul este triploid și rezultă în urma dezvoltării zigotului accesoriu.

În semințele leguminoaselor, stocarea proteinelor de rezervă se face în cotiledoane, formațiune care are aceeași masă ereditară și origine ca și celelalte părți ale embrionului. Poate tocmai din această cauză nu numai cotiledoanele dar și părțile de creștere ale embrionului (radicu-

la, tulpinița și frunzele embrionare) conțin proteine de rezervă. Astfel, la semințele de fasole (*Phaseolus vulgaris*) am arătat că principalul component proteic al cotiledoanelor (faseolina?) se găsește și în axul embrionar, este adevărat însă că într-un procent de 3 ori mai mic decît în cotiledoane [3]. Legumina și vicilina, globulinele de rezervă ale semințelor de bob, se pot detecta atît în cotiledoane cît și în axul embrionar [4]. Singura deosebire este de ordin cantitativ și privește raportul dintre vicilină și legumină ; el este 0,48 la cotiledoane și 2,44 la axul embrionar [4]. Aceste date, obținute prin analiză electroforetică, pot fi comparate cu cele calculate de A.V. Blagoveșcenschi [5] care arată că în sămînța de bob intactă raportul vicilină/legumină

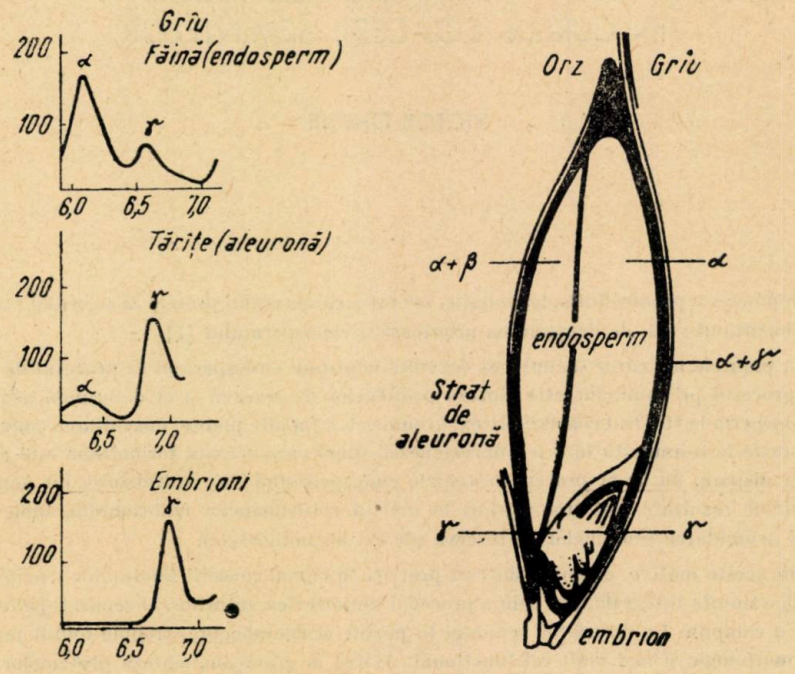


Fig. 1. — Distribuția intraseminală a globulinelor în sămînța de grîu și orz (adaptat după [10] și [11]).

este 0,33. Mai mult, la semințele de nucă braziliană, proteinele de rezervă sînt înmagazinate cu precădere în axul embrionar [6].

Celulele endospermului și embrionului conțin și o altă categorie de substanțe proteice, eterogene din punct de vedere funcțional, cuprinse sub denumirea de proteine protoplasmatice. Acestea sînt asociate cu structura fundamentală a celulei, fiind localizate atît în citoplasmă cît și în celelalte formațiuni intracelulare, cu excepția corpilor proteici [7]. Proteinele protoplasmatice sînt înzestrate cu activități enzimatice variate [8] și nu reprezintă decît un procent mic din proteina totală a întregii semințe.

La graminee, albuminele și globulinele, care constituie probabil proteinele protoplasmatice [9], nu depășesc 10% din proteina totală [10]. Distribuția intraseminală a globulinelor este inegală și prezintă variații calitative distincte (figura 1).

Se observă că în endosperm predomină α-globulina (G.M. = 26 000), iar în embrion γ-globulina (G.M. = 160 000). Rezultate similare s-au obținut la orz, la care s-a semnalat prezența α-și β-globulinei (G.M. = 100 000) în endosperm, iar a γ-globulinei în embrion. Faptul

că C. Danielsson [10] găsește uneori în embrionul de grîu cantități mici de α-globulină sau în endosperm urme de γ-globulină poate fi pus pe socoteala imperfecțiunilor tehnicii de separare a formațiunilor și impurificării lor reciproce.

Aceste rezultate arată că în semințele gramineelor există proteine protoplasmatice prezente atît în embrion cît și în endosperm, alături de un grup de proteine caracteristice fiecărei formațiuni și care le imprimă acestora un caracter proteic particular.

Proteinele protoplasmatice din semințele leguminoaselor sînt, ca și cele de rezervă, tot de natură globulinică. Numai o mică parte din proteinele semințelor sînt de natură albuminică și ele aparțin probabil grupului proteinelor protoplasmatice [12]. Unii autori sînt tentați să considere că și la semințele leguminoaselor, ca și la graminee, proteinele de rezervă se deosebesc de cele protoplasmatice prin natura lor chimică : albuminele ar constitui proteina protoplasmatică, iar globulinele ar alcătui proteina de rezervă (vezi de exemplu [9] și [13]). Această clasificare s-a bazat pe experiențe care au arătat că din semințele leguminoaselor se pot extrage, în cantități mari, una sau două tipuri de globuline, relativ omogene, și cantități mici de albumine cu o eterogenitate fizico-chimică marcată.

Astfel, cu ajutorul ultracentrifugării [10] [14], electroforezei libere [8] [15] și pe hîrtie [16] s-a arătat că în semințele de mazăre există două globuline omogene, vicilina și legumina, și o albumină — eterogenă — legumelina.

Deoarece legumina și vicilina reprezintă mai mult de 85% din întreaga proteină a seminței, și cum ele sînt afectate substanțial în procesul germinativ [17], părea logic să se conchidă că globulinele îndeplinesc un rol de rezervă în sămînța germinată. Dar electroforeza în geluri, dotată cu o putere de rezoluție mai mare, a arătat că în sămînță există numeroase proteine de tip globulinic care diferă, prin proprietățile lor fizico-chimice și imunochimice, de globulinele majoritare, bine caracterizate, ale semințelor [3] [4]. Astfel, proteinele din sămînța de mazăre, care pot fi separate numai în 2—4 fracțiuni prin electroforeza liberă sau pe hîrtie, pot fi fracționate într-un grad mult mai înaintat (9—10 fracțiuni) prin electroforeza în gel de agar, cînd pe lîngă legumină și vicilină se evidențiază numeroși alți componenți [18] [19] (fig. 2). O parte din aceștia sînt de natură globulinică și provin din protoplasma celulară.

La semințele de fasole am arătat [3] că proteinele protoplasmatice sînt distribuite atît în cotiledoane cît și în axul embrionar. S-a putut arăta pe căi fizico-chimice că axul embrionar conține proteine protoplasmatice specifice, alături de alte proteine protoplasmatice pe care el le conține în comun cu cotiledoanele. Ultimele, deși au caractere imunochimice comune, se pot diferenția în ce privește natura glucidelor cu care sînt conjugate, precum și prin comportarea lor la salifiere și activitatea lor polarografică. De aceea, în aceste cazuri reacțiile imunochimice încrucișate între proteinele protoplasmatice comune cotiledoanelor și axului embrionar ar putea fi cauzate numai de corespondența unui număr oarecare de grupări determinante. De altfel, J. Kloz și V. Turkova [20] au arătat că chiar proteine bine individualizate, ca legumina și vicilina, au un anumit grad de asemănare imunochimică. La sămînța unei alte plante leguminoase, și anume la bob (*Vicia faba*), nu am putut arăta că cotiledoanele și axul embrionar conțin proteine protoplasmatice specifice, ci dimpotrivă am constatat o identitate imunochimică a proteinelor din cotiledoane și axul embrionar [4] [21]. Rezultatele obținute la bob și fasole sînt contradictorii numai în aparență. Ele se pot explica dacă se ține seama de faptul că proteinele protoplasmatice îndeplinesc un rol cu atît mai specific, cu cît formațiunea de care aparțin este mai diferențiată morfologic și funcțional. Cu cît gradul diferențierii atins de axul embrionar, înainte ca dezvoltarea lui să fie oprită de încheierea coacerii, este mai avansat, cu atît este mai probabil ca el să conțină proteine specifice diferite de cele ale cotiledoanelor. Or, în momentul încheierii coacerii, la semințele de fasole diferențierea morfologică dintre cotiledoane și axul embrionar este mai marcată decît la bob. De aceea și diferențierea antigenică dintre cele două formațiuni este mai netă la fasole și poate fi sesizată prin metodele de imunodifuzie folosite de noi.

Această explicație arată că, cel puțin pentru semințe la care nu există o diferențiere intraseminală, caracterul proteic al formațiunilor de creștere și de rezervă nu diferă sensibil. Diferențierea lor se face abia în cursul procesului de germinație. De aceea, în aceste cazuri se poate vorbi de un caracter proteic unitar al întregii semințe [4].

2. — DIFERENȚIEREA CARACTERULUI PROTEIC AL SEMINȚELOR ÎN TIMPUL COACERII

În lumina datelor prezentate, apariția și consolidarea caracterului proteic al seminței în cursul coacerii trebuie examinate în raport cu dinamica biosintezei proteinelor de rezervă din formațiunile de rezervă și a celor protoplasmatice specifice din formațiunile de creștere. Momentul în care se sintetizează primele proteine de rezervă marchează evoluția caracterului proteic de la stadiul de zigot la cel de sămînță. Alt moment important constituie apariția proteinelor specifice formațiunilor de creștere. Acest eveniment este strîns legat de diferențierea morfologică a acestor formațiuni și de aceea la semințele cu embrionul nediferențiat fenomenul poate lipsi.

În formațiunile de rezervă procesul predominant este sinteza proteinelor de rezervă. Astfel, în perioada după terminarea înfloririi și pînă la completa coacere a semințelor, conținutul în substanțe proteice al cotiledoanelor de mazăre se mărește de 200 de ori, iar cel al cotiledoanelor de fasole de 100 de ori [22]. În timpul dezvoltării endospermului de grîu, din a 12-a zi de la înflorire și pînă la a 26-a zi se constată că azotul proteic crește de mai mult de 10 ori, deși în această perioadă în endosperm există doar o slabă diviziune celulară [23].

Sinteza proteinelor din sămînță se face pe socoteala azotului neproteic care este translocat aici din părțile vegetative ale plantei. Aprovizionarea seminței cu material nutritiv începe imediat după fecundație și continuă neîntrerupt pînă în fazele ultime ale coacerii seminței. *Sinteza proteinelor se face într-o succesiune determinată: întîi se formează proteinele protoplasmatice și apoi cele de rezervă* [13].

Cercetările efectuate de C. Danielsson [17] au arătat că în cursul coacerii semințelor de mazăre vicilina și legumina se sintetizează în diferite proporții : procentul relativ de vicilină descrește, în timp ce cantitatea de legumină crește. În acest timp, fracțiunea albuminică crește mult și în proporție constantă. Apariția leguminei și vicilinei are loc într-un stadiu de coacere destul de tardiv al seminței. Înaintea acestui stadiu, în semințe se pot identifica diferiți compuși proteici cuprinși de I. Raacke [24] sub denumirea de albumine și care au o constantă de sedimentare de 1—3 *S*. Tot în această fază timpurie, în semințele necoapte se pot identifica componente cu greutate moleculară mare (18—20 *S*). Deoarece aceste rezultate au fost obținute pe sămînța întreagă, fenomenele ce se petrec în cotiledoanele în formare sînt greu de separat de cele din endospermul ce se consumă treptat. Acest neajuns a fost îndreptat de I. Raacke într-o altă lucrare [25], în care modificările proteinelor în cursul coacerii au fost studiate numai pe cotiledoane. Măsura în care rezultatele sînt influențate de cercetarea separată a procesului pe formațiuni, este redată în figura 3.

Se observă că sinteza vicilinei este mai timpurie decît aceea a leguminei, însă că ritmul sintezei ei scade spre sfîrșitul coacerii. În stadiul final de coacere se observă în cotiledoane o creștere a albuminei. Această creștere nu se observă în sămînța integrală, deoarece ea este acoperită de scăderea masivă a albuminei care se hidrolizează în endosperm. Hidroliza proteinelor din endosperm și absorbția produșilor de hidroliză de către cotiledoane sînt ilustrate în tabela 1.

Faptul că albumina este prezentă în semințe înaintea apariției globulinelor de rezervă, a determinat pe I. Raacke să presupună că există o formare de globuline via albumine. Autoarea aduce în sprijinul acestei concepții și acele date din literatură care arată că sinteza globulinelor poate să se facă o dată ce s-a format albumina, chiar în semințele coapte și detașate de pe plantă [26]. Totodată, apariția acestor globuline nu este asociată cu schimbări mari ale con-

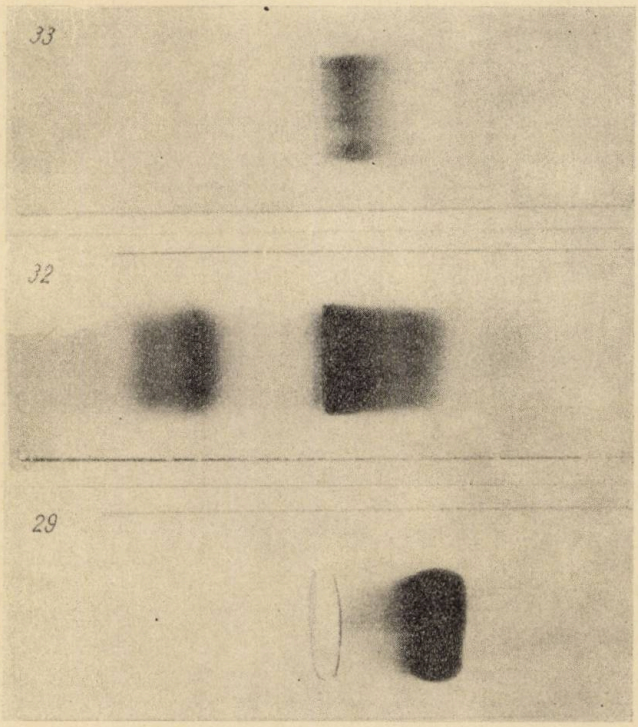


Fig. 2. — Analiza electroforetică în gel de agar a proteinelor din sămînța de mazăre [18] : proteină totală (mijloc), vicilina (sus), legumina (jos).

ținutului în azot aminic. Această ultimă constatare sugerează că globulinele ar putea rezulta prin polimerizarea albuminei. Această concepție este interesantă, mai ales dacă ținem seama că prin albumină autoarea cuprinde un grup de substanțe proteice eterogene, incomplet caracterizate prin ultracentrifugare și care au un coeficient de sedimentare de 1—3 *S*. Cum datele actuale privind structura vicilinei și leguminei [27—29] arată că aceste proteine sînt formate

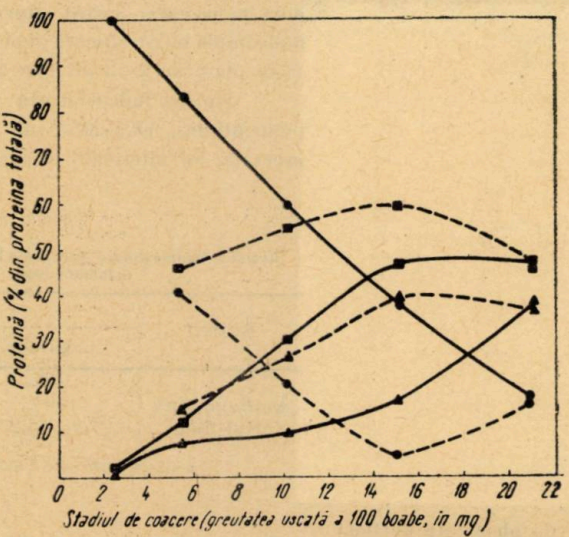


Fig. 3. — Dinamica acumulării proteinelor în sămînța de mazăre în cursul coacerii (adaptat după [24] și [25]); linia continuă : sămînța integrală ; linia întreruptă : cotiledoanele.

▲ legumina (L); ▬ vicilina (V); ● albumina (legumelina) (A).

din mai multe lanțuri polipeptidice, este posibil ca în fazele timpurii ale coacerii să predomine sinteza lanțurilor, iar apariția vicilinei și leguminei să fie rezultatul unirii acestor lanțuri, atunci cînd concentrația lor a atins în celule o concentrație critică.

Foarte recent J. Kloz și colab. [30] au arătat că în ultimele faze ale maturizării semințelor de fasole, atunci cînd începe deshidratarea seminței, apar brusc cîteva proteine noi, aparent sintetizate din lanțuri polipeptidice preformate.

Tabela 1

Variația azotului proteic în endospermul și cotiledoanele de mazăre în timpul coacerii (după [24])

Fază de coacere*	Cotiledoane	Endosperm + tegument
IV(5,4)	1,48	0,43
V(10,17)	1,69	0,39
VI(15,10)	1,65	0,24
VII(20,99)	3,18	0,07

* Fazele s-au luat după greutatea uscată a 100 boabe de mazăre, valoare trecută în paranteză (mg).

Posibilitatea legării lanțurilor polipeptidice în citoplasmă, aparent în afara sistemului biosintetic, a fost arătată pentru lacticodehidrogenază [31].

Faptul că substanțele proteice se complexează în cursul dezvoltării ontogenetice în general, și al coacerii semințelor în special, este susținut și de V.A. Blagoveșcenski [5], pe baza unor lucrări personale [32] sau din literatură [33] [34], care arată o creștere a greutății moleculare pe măsură ce coacerea avansează. În acest caz, complicarea arhitecturii moleculare poate să aibă loc pe calea legării cîtorva molecule proteice mai simple într-o singură moleculă, cu o greutate moleculară de 2—3 ori mai mare.

Sinteza independentă a diferitelor lanțuri polipeptidice, efectuată sub control genetic, și asociația lor ulterioară în afara sistemului biosintetic, pot face ca două tipuri de globuline să conțină cîteva lanțuri polipeptidice comune și să prezinte astfel o înrudire structurală. Această posibilitate este verificată, cel puțin pentru legumina și vicilina din mazăre, care prezintă o înrudire imunochimică marcată (tabela 2) (figura 4).

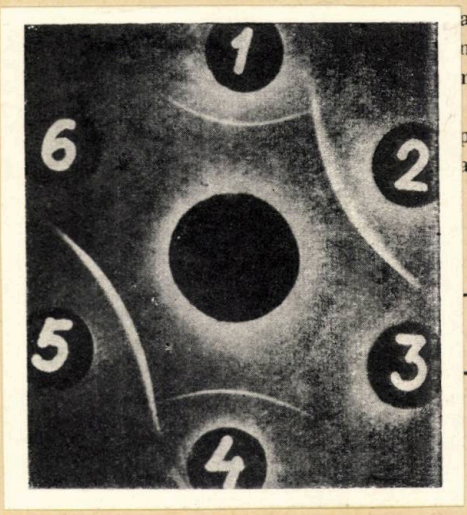


Fig. 4. — Reacția de identitate parțială dintre legumină și vicilină, evidențiată prin testul dublei difuzii [20] (reprodusă cu permisiunea dr. J. Kloz). Godeul central : ser de iepure antivicilină ; *1* și *4* = legumină ; *2* și *5* = vicilină. Se observă că serul antivicilină detectează nu numai vicilina dar și legumina, deși mai slab. Zonele de precipitare ale vicilinei și leguminei se întretaie la extremități, semn de neidentitate, deși ele dau reacție încrucișată.

Tabela 2

Reacțiile imunochimice încrucișate între legumină și vicilină (adaptată după [20])*

Antiser	Antigen	
	Legumină	Vicilină
Antilegumină	100%	30,4—46,1%
Antivicilină	27,8—45,2%	100%

* Reacția omologă este notată cu 100%.

Explicația dată de noi are ca scop să prezinte într-o altă lumină presupunerile lui I. Raacke, deoarece în prezent este greu de acceptat că sinteza globulinelor de rezervă este dependentă de aceea a proteinelor protoplasmatice. Dimpotrivă, lucrările recente ale lui R. K. Morton și colab., care vor fi prezentate în cele ce urmează, arată că sinteza acestor două categorii de proteine este independentă, cel puțin pentru semințele unor graminee.

3. — LOCALIZAREA INTRACELULARĂ A SINTEZEI PROTEICE

Proteinele de rezervă se acumulează în endospermul gramineelor sub forma unor granule cu dimensiuni diferite, care au fost numite „corpi proteici" (*protein bodies*). Prin microscopie electronică s-a putut arăta că acești corpi proteici au o mărime cuprinsă între 0,2—0,3μ. Dimensiunile lor cresc în timpul coacerii, astfel că dacă la 19 zile ei au 0,2—5 μ, la 30 de zile majoritatea corpilor proteici ating dimensiunea de 20 μ [23][35]. La semințele de grîu s-a arătat că proteinele de rezervă — solubile în acid acetic — provin din corpii proteici, iar din citoplasmă se extrag cu pirofosfat proteine caracteristice denumite proteine citoplasmatice.

În semințele leguminoaselor s-au identificat, în special în cotiledoane, formațiuni cuprinse sub termenul general de incluziuni ergastice și care reprezintă de fapt tot corpi proteici [36].

Analiza electroforetică în gel de amidon [37] și compoziția în aminoacizi [38] au demonstrat că la grîu corpii proteici sînt alcătuiți în special din proteine de rezervă (prolamină). În afară de aceștî compuși, în preparatele purificate de corpi proteici s-au pus în evidență enzimele de activare ale aminoacizilor, ribozomi, fosfați organici și ATP-fosfoinozitol-fosfotransferaza [39] [40]. Retenția acestor componente poate fi atribuită prezenței unei structuri care are asociate membrane și care previne pierderea enzimelor și substratelor. Deoarece corpii

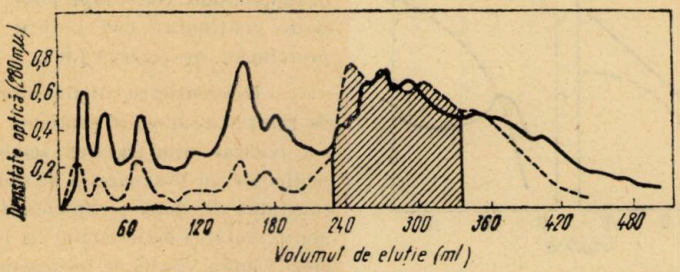


Fig. 5. — Cromatografia pe DEAE-celuloză a diferitelor proteine extrase din cotiledoanele de mazăre [45]. Linia continuă: proteina totală; linia întreruptă: proteina din corpii proteici; regiunea haşurată marchează zona în care se eluează fracțiunile globulinice. Eluția s-a realizat printr-un gradient de NaCl în tampon Tris 0,01 M, pH = 7,8, care crește liniar de la 0 la 0,5 M.

proteici sînt capabili de a cataliza încorporarea aminoacizilor, R. K. Morton și colab. [41][42] au propus termenul de „proteoplast" pentru această formațiune intracelulară [40]. Proteoplastele sînt, deci, unități structurale în care proteinele de rezervă se acumulează printr-un proces de secreție internă [43]. Proteoplastul din semințe apare astfel ca o structură analoagă cloroplastelor, avînd o organizare complexă și toate enzimele și celelalte componente necesare pentru sinteza netă a proteinelor de rezervă.

În semințele leguminoaselor, globulinele de rezervă sînt localizate tot în corpii proteici. Astfel, în corpii proteici din cotiledoanele de arahide [44][36] și de mazăre [45] s-au putut identifica prin cromatografie pe DEAE-celuloză globulinele de rezervă (probabil vicilina și legumina) [45] (figura 5). Aceste date par să arate că și la leguminoase proteinele de rezervă au o localizare intracelulară distinctă de aceea a proteinelor protoplasmatice. Din păcate, tehnica de izolare a corpilor proteici nefiind încă tot așa de bine pusă la punct ca la cereale, rezultatele obținute trebuie interpretate cu prudență. Astfel, în cursul izolării corpilor proteici aceștia pot pierde o parte din proteinele caracteristice, care pot să apară în celelalte fracțiuni ale centrifugatului, impurificîndu-le. De aceea, cunoștințele actuale privitoare la biosinteza proteinelor de rezervă și a celor citoplasmatice se bazează exclusiv pe lucrările lui R. K. Morton și colab., care au folosit grîul ca sămînță de experiență. În cele ce urmează ne vom referi mai ales la aceste lucrări, care tind să arate că în semințe există două sisteme independente de sinteză proteică, care activează simultan: unul sintetizează proteinele de rezervă și are sediul în corpii proteici, iar celălalt, cu sediul în reticulul endoplasmatic, sintetizează proteinele citoplasmatice. Intrarea în funcțiune a celor două sisteme sintetice se face succesiv, sinteza proteinelor de rezervă fiind, așa cum am spus înainte, mai tardivă. De altfel, însăși dinamica apariției corpilor proteici arată că ei pot fi semnalați numai la un moment dat al dezvoltării celulelor care, desigur, posedă deja proteinele citoplasmatice.

Caracteristicile sistemelor care concură la formarea proteinelor de rezervă și a celor citoplasmatice au fost studiate pe sămînța intactă, pe endosperm izolat, pe omogenate de țesut și pe componenți celulari izolați (corpi proteici și preparate de „supernatant").

Folosind sămînța intactă în diferite stadii de coacere sau omogenatele de endosperm corespondente, s-a putut arăta că încorporarea aminoacizilor marcați cu carbon radioactiv (^{14}C) are loc simultan atît în proteinele de rezervă cît și în cele citoplasmatice [42]. Aminoacizii încorporați nu sînt incluși la pozițiile C-terminale, de aceea ei nu pot fi deplasați cu un exces de aminoacizi neradioactivi sau printr-o dializă față de uree 2 M sau apă [41]. Urmărind încorporarea ^{14}C-prolinei și a ^{35}S-sulfatului în omogenatele endospermului, se constată că prolina se încorporează mai bine în corpii proteici decît în supernatant. Acest fapt poate că este cauzat și de conținutul mai ridicat în prolină al proteinelor de rezervă [46].

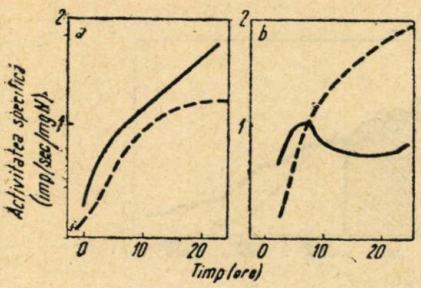


Fig. 6. — Efectul fluoroacetatului de sodiu asupra încorporării ^{35}S-sulfatului în proteinele de rezervă și în cele citoplasmatice în endospermul seminței de grîu [42] *a* = incubare cu apă (martor); *b* = incubare cu fluoroacetat (0,05 M).

Linia continuă = proteina citoplasmatică; linia întreruptă = proteina de rezervă (din corpii proteici).

Diferențierea căii de sinteză a proteinelor de rezervă de aceea a proteinei citoplasmatice s-a realizat prin tratarea semințelor de grîu secționate cu fluoroacetat de sodiu 0,05 M. S-a constatat că, după o expunere la sulfat radioactiv, tratarea materialului cu inhibitor nu are efect asupra vitezei de încorporare a radioactivității în proteina de rezervă, în timp ce încorporarea ei în proteina citoplasmatică este inhibată după o incubare de 6 ore [42](figura 6). Știind că efectul fluoroacetatului se datorește scăderii producției de ATP (inhibarea aconitat-hidratazei), rezultă că ATP-ul necesar pentru încorporarea radioactivității în proteina de rezervă este furnizat pe o altă cale decît a acizilor tricarboxilici. Incorporarea aminoacizilor, independent de un sistem de generare a ATP-ului, este asigurată de formarea ATP-ului prin reacția catalizată de o fosfotransferază : inozitol hexafosfat + ADP $\rightleftharpoons$ fosfoinozitol + ATP. Din corpii proteici dezintegrați prin ultrasunete s-a izolat o enzimă, denumită fosfoinozitol-fosfotransferaza [39] [40], care acționează asupra fitatului legat de proteină (sau asupra unui derivat al fitatului) și eliberează grupările fosforil necesare sintezei ATP-ului. Astfel, fitatul din corpii proteici apare ca o rezervă de grupări fosforil (fosfagenul plantelor) ce menține ATP-ul la o concentrație optimă pentru funcțiile sintetice. Datele de mai sus sînt reprezentate schematic în figura 7.

Pe baza cunoștințelor actuale asupra controlului sintezei proteice, formarea independentă a două grupuri de proteine, de rezervă și funcționale, localizate separat în aceeași celulă, implică ca ribozomii și acizii ribonucleici mesageri corespondenți să fie și ei diferiți. În corpii proteici s-au identificat toți componenții de rezervă necesari sintezei proteice, mai puțin ARN-ul mesager, a cărui prezență este doar presupusă [25][39]. Astfel, din corpii proteici, prin ruperea membranei, s-au extras și s-au purificat aminoacizi, ARN-ul de transfer, enzimele de activare a aminoacizilor, aminoacil-ARN și ribozomii. Prezența lor aici nu poate fi pusă pe socoteala unei impurificări citoplasmatice, deoarece acești componenți nu trec în soluție decît după ruperea membranei printr-o dezintegrare mecanică viguroasă. Datele obținute sugerează de asemenea că sintetazele aminoacil-ARN din fracțiunea supernatantului nu sînt diferite de acelea ale corpilor proteici. Astfel, enzimele extrase din corpii proteici sînt capabile să catalizeze formarea aminoacil-ARN cu ajutorul unui ARN din supernatant.

Diferențe între corpii proteici și supernatant se constată însă la nivelul ribozomilor. Astfel, din corpii proteici s-au izolat ribozomi cu coeficienții de sedimentare 107 *S*, 76 *S*, 53 *S* și 35 *S*, în timp ce din fracțiunea supernatantului s-au evidențiat ribozomi cu coeficienți mai mari : 120 *S*, 80 *S*, 60 *S* și 40 *S*. Ribozomii din supernatant provin, probabil, în cea mai mare măsură, din ruperea reticulului endoplasmatic. Acesta conține ca fracțiune principală componentul 80 *S*, ceea ce este în bună concordanță cu datele obținute pentru ribozomii din plan-

tulele de mazăre [47]. Ribozomii proteoplastelor conțin, probabil, un ARN mesager care poartă codul formării proteinelor de rezervă. Acest ARN mesager apare însă ca fiind relativ stabil, deoarece concentrații critice de actinomicină D nu au inhibat încorporarea aminoacizilor în proteinele de rezervă. Cum acumularea proteinelor de rezervă în semințe are loc la sfîrșitul ciclului de viață al plantelor, se poate să nu fie necesar un control activ al acestui proces și acest fapt să se concretizeze în existența unui ARN mesager stabil. De altfel, existența unui

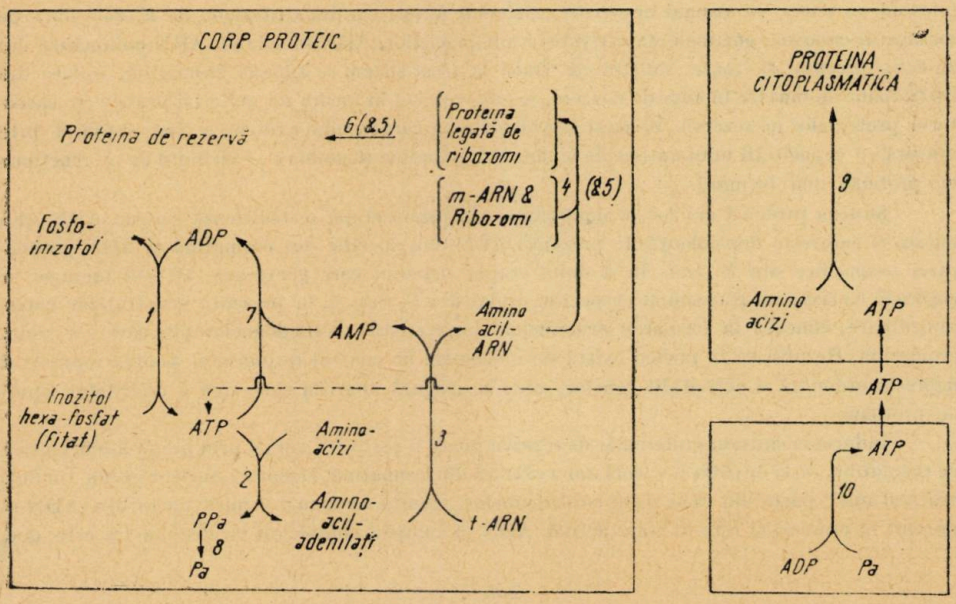


Fig. 7. — Schema căilor de sinteză a proteinelor de rezervă și a proteinelor citoplasmatice [40] (reprodusă cu permisiunea dr. J. Raison).
Fiecare din reacțiile *1*—*8* au fost identificate în corpii proteici și sînt catalizate de următoarele enzime sau sisteme enzimatice:

(*1*) ATP — fosfoinozitol fosfotransferază; (*2*) enzimele de activare a aminoacizilor; (*3*) enzimele de activare a aminoacizilor și ARN-*t*; (*4*) ribozomii din corpii proteici, conținînd ARN-*m*; (*5*) ATP-nucleoziddifosfat-fosfotransferaza care catalizează formarea GTP-ului, necesar pentru reacțiile *4* și *6*; (*6*) sistemul de eliberare a proteinei sintetizate; (*7*) ATP-adenilat-fosfotransferaza; (*8*) pirofosfataza. Reacția (*9*) cuprinde reacțiile ATP-dependente din preparatele de supernatant care conduc la formarea proteinelor citoplasmatice în afara corpilor proteici. Reacția (*10*) arată formarea ATP-ului legată de oxidarea substratelor în endosperm; aici este locul probabil de acțiune al fluoroacetatului (vezi fig. 6). Deplasarea posibilă a ATP-ului este indicată cu linie punctată. Filtratul din corpii proteici acționează cu un tampon al sistemului ATP-ADP.

ARN mesager cu viață lungă a fost semnalată în semințele de bumbac [48], la sinteza proteinelor din penele păsărilor [49], în unele celule bacteriene [50] și chiar în ficat [51].

Faptul că în fazele finale ale coacerii nu există un control activ al sintezei proteinelor reiese din numeroase lucrări (vezi, de exemplu [52]) care au arătat că în această perioadă nu există o corespondență între sinteza proteică și conținutul în acizi nucleici, raportul ARN/proteină scăzînd puternic. După părerea noastră, această comportare s-ar putea explica astfel: fazele timpurii ale coacerii, în care se constată un paralelism strict între sinteza proteică și conținutul în acizi nucleici, se caracterizează printr-o formare intensă de ribozomi, la început în reticulul endoplasmatic, apoi și în corpii proteici. Deci, paralelismul dintre sinteza celor doi componenți este asigurat în primul rînd de sinteza concordantă a ribozomilor și a proteinelor citoplasmatice. Spre sfîrșitul coacerii nu mai are loc formarea ribozomilor, dar sinteza proteinelor de rezervă, modelată pe ARN-ul mesager stabil, continuă, astfel că începe scăderea raportului

ARN/proteină. Creșterea sintezei proteice fără o formare a ribozomilor a fost constatată și în alte cazuri, de exemplu la dezvoltarea ouălor de broască [53].

4. — BIOSINTEZA PROTEINELOR DE REZERVĂ „IN VITRO"

Sinteza proteinelor de rezervă a fost realizată „in vitro" de J. Bonner și colab. [54], folosind un sistem ribozomal nespecific. Sistemul folosit conținea ribozomi de *E. coli* liber de mesagerul endogen, enzimele de activare a aminoacizilor, ARN-ul solubil, ARN-polimeraza din *E. coli*, precum și toate substratele. Dacă la acest sistem se adaugă cromatină, izolată din cotiledoane de mazăre în curs de coacere, se sintetizează în mediu un material proteic cu caracterul proteinelor de rezervă. În acest caz identitatea caracterului proteic a fost stabilită prin măsurarea capacității unui antiser de iepure antiglobuline (legumină + vicilină) de a reacționa cu proteina nou formată.

Sinteza proteică are loc în două etape. În prima etapă se realizează sinteza ARN-ului mesager, care este dependentă de prezența ADN-ului specific din cromatină și ARN-polimerazei nespecifice din *E. coli*. În a doua etapă, sistemul care generează ARN-ul mesager se cuplează cu sistemul ribozomial nespecific, izolat din *E. coli*, și, în prezența substratelor corespunzătoare, concură la formarea proteinelor caracteristice cotiledoanelor din care s-a izolat cromatina. Rezultă că în nucleu există un mecanism de control responsabil pentru represia și depresia ordonată a activității genelor, ceea ce asigură apariția succesivă a diferitelor tipuri de proteine.

Inducerea sintezei proteinelor de rezervă poate fi realizată numai prin preparate integrale de cromatină, nu și de către nucleohistona extrasă din cromatină. Deoarece nucleohistona include cea mai mare parte din cromatina cotiledoanelor, rezultă că numai o mică parte din ADN-ul prezent în cromatină este în stare activă. ADN-ul complet complexat cu histona nu este deci

Tabela 3

Sinteza globulinelor din sămînța de mazăre în diferite organe ale plantei de mazăre (după [54])

Organ	Încorporarea leucinei C-14 în proteină* (imp/min/ml)		Procentul globulinei (% din proteina totală)
	Proteina totală	Globulină	
Cotiledoane în fază de coacere timpurie	7 100	337	4,7
Cotiledoane în fază de coacere tardivă	9 200	862	9,3
Floare	17 500	510	2,9
Rădăcină	17 150	31	0,18
Mugure apical	11 600	14	0,12

* Țesuturile s-au incubat separat cu L-leucină radioactivă pentru 2 ore la 25°C. Proteina solubilă totală s-a determinat prin măsurarea radioactivității supernatantului dializat, obținut prin centrifugarea omogenatului la 105 000 *g*. Globulina s-a determinat prin precipitarea ei din supernatant cu antiserul corespondent, spălări repetate, dizolvare în hidrat de amoniu 0,2 N și măsurarea radioactivității.

capabil să mențină sinteza de ARN dependentă de ADN. Deoarece suprimă capacitatea ADN-ului de a participa la sinteza ARN-ului, și, indirect, la sinteza proteinelor de rezervă, histona poate fi considerată ca un supresor genetic [55][56].

Capacitatea plantelor de a sintetiza globuline (de rezervă) se limitează numai la cotiledoane și, în mai mică măsură, la floare. Celelalte organe ale plantelor nu sînt capabile să sintetizeze aceste proteine într-o măsură semnificativă (tabela 3).

Se observă că globulina constituie un component important al cotiledoanelor de mazăre în dezvoltare. Ea reprezintă 4—10 % din proteina totală sintetizată, cantitatea fiind dependentă de stadiul de coacere la care s-au recoltat semințele. Sinteza proteică „in vitro" nu dă deci o proporție atît de mare de globuline ca cea care caracterizează cotiledoanele *in vivo*. Dacă floarea produce cantități semnificative de globuline, în schimb pentru rădăcină și muguri valorile găsite pot fi cauzate de contaminări ale precipitatelor imune sau de reacții imunochimice nespecifice. De altfel, preparatele globulinice fiind obținute prin procedeul lui Danielsson [10], nu sînt pure. Preparatele pot conține și alte globuline aparținînd protoplasmei, de aceea antiserul preparat poate avea capacitatea de a precipita nu numai globulinele de rezervă, ci și cel puțin o parte din cele protoplasmatice. În aceste condiții, după părerea noastră, este greu de precizat dacă floarea este capabilă de sinteza unor proteine asemănătoare cu cele de rezervă sau cu cele protoplasmatice ale semințelor. Dacă se consideră că formarea proteinelor de rezervă coincide cu apariția intracelulară a corpilor proteici, și cum aceste formațiuni apar numai la un moment dat al coacerii semințelor, atunci rezultă că globulinele sintetizate în floare sînt mai degrabă asemănătoare cu globulinele protoplasmatice.

Tabela 4

Sinteza globulinelor din sămînța de mazăre de către sistemul ribozomial din *E. coli*, ca răspuns la diferite matrițe necesare pentru sinteza ARN mesager [54]

Matriță pentru sinteza ARN	Încorporarea leucinei C-14 în proteine (imp/min/ml)		Procentul globulinei (% din proteina totală)
	Proteină totală	Globulină	
Cromatină din cotiledoane *	14 000	226	1,61
ADN din cromatina cotiledoanelor	50 100	157	0,31
Cromatina din mugure apical *	41 200	54	0,13
ADN din cromatina de mugure	14 200	72	0,51
	15 200	60	0,40

* Preincubată la 60°C, timp de 5 min, pentru a inactiva ARN-polimeraza cromozomială.

Dependența sintezei globulinelor de natura cromatinei folosite este redată în tabela 4

Din datele de mai sus se desprind două concluzii principale, și anume: *1*) Globulinele se sintetizează numai ca răspuns la cromatina cotiledoanelor. Este adevărat că și cromatina din mugure este capabilă să inducă sinteza proteică, la fel de bine ca cea din cotiledoane, dar proteina formată nu este globulină. *2*) Deși nu sintetizează globulina, cromatina din muguri posedă gena sau genele capabile de această sinteză. Această capacitate se dezvăluie dacă în locul cromatinei din mugure se folosește un preparat de ADN extras din ea, liber de histonă. Cantitatea de radioactivitate prinsă în globuline (aproximativ 0,5 % din proteina totală) este apreciabil mai mare decît cea pe care o formează cromatina de mugure (0,13 %) sau mugurii

de mazăre *in vivo* (0,12%, în tabela 3) și este asemănătoare cu cea furnizată de ADN din cromatina cotiledoanelor (0,31%). Se pare deci că prin îndepărtarea histoanelor din cromatina mugurilor de mazăre, în care genele pentru sinteza globulinelor sînt represate, se produce un ADN capabil să susțină sinteza globulinelor. Nici aici, așa cum am arătat mai sus, nu se poate preciza dacă este vorba de globulinele de rezervă sau de cele protoplasmatice ale semințelor. Oricum însă, experiențele arată că proteinele din sămînță pot fi sintetizate în cantități mici și de alte țesuturi. Acest fapt este un suport pentru concepția că în tot ciclul evolutiv, de la zigot la planta matură, plantele pot să posede anumite caractere proteice comune [1][57].

CONCLUZII

În timpul coacerii semințelor se manifestă două sisteme de sinteză proteică, independente care activează simultan : unul sintetizează proteinele de rezervă și are sediul în corpii proteici, iar celălalt sintetizează proteinele protoplasmatice (citoplasmatice) și este localizat în reticulul endoplasmatic. Intrarea în funcțiune a acestor două sisteme în cursul coacerii se face succesiv, sinteza proteinelor de rezervă fiind mai tardivă. Această comportare este legată de faptul că în primele stadii de coacere predomină diviziunea celulară, deci sinteza proteinelor protoplasmatice, iar diferențierea celulară și formarea corpilor proteici se petrece numai la un moment dat al coacerii semințelor. Acumularea proteinelor de rezervă în semințe are loc la sfîrșitul ciclului vital al plantelor, cînd acestea pierd capacitatea de a controla activ procesul sintetic. De aceea, în fazele finale ale coacerii nu mai există o corespondență între sinteza proteică și conținutul în acizi nucleici. Explicația propusă de noi pentru această comportare anormală se bazează pe acele date din literatură care au semnalat în semințe prezența unui ARN mesager de viață lungă și pe oprirea formării ribozomilor în fazele finale ale coacerii, fenomen constatat și la dezvoltarea ouălor de broască.

Proteinele de rezervă pot fi sintetizate *in vitro* cu ajutorul unui sistem ribozomial nespecific, izolat din *E. coli*, cu condiția folosirii unui ADN care să provină din formațiunile de rezervă ale semințelor în curs de coacere.

Prezentat la redacție la 15 februarie 1966

Institutul de biochimie al Academiei Republicii Socialiste România

BIBLIOGRAFIE

1. V. Gheție, *Symposium on Mutational Process*, Prague, 1965.
2. F. C. Steward, J. F. Thompson, *Protein and protein metabolism in plant*, în H. Neurath, K. Bailey, *The Proteins*. Acad. Press., New York, 1953, II, A.
3. V. Gheție, L. Buzilă, St. cerc. biochim., **4**, 241 (1961).
4. V. Gheție, L. Buzilă, St. cerc. biochim., **5**, 541 (1962).
5. A. V. Blagovescenski, Anal. rom. sov., seria biol., **4**, 260 (1960).
6. T. B. Osborne, *The vegetable proteins*, Longmans, London, 1929.
7. V. Gheție, St. cerc. biochim., **9**, 59 (1966).
8. V. L. Kretovici, A. A. Bundel, S. S. Melik-Sarkisian, K. M. Stefanovici, Biohimiia, **19**, 208 (1954).
9. E. W. Yemm, *Biochemical mechanisms in the synthesis and breakdown of proteins*, în W. Ruhland, *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, **VIII**, 437 (1958).
10. C. E. Danielsson, Biochem. J., **44**, 387 (1949).
11. A. V. Blagovescenski, *Biohimiia obmena azotsoderjașcih veșcestv u rastenii*, Izd. Akad. Nauk SSSR, Moskva, 1958.
12. V. V. Saianova, I. I. Gofman, Biohimiia, **30**, 209 (1965).

13. H. S. McKee, *Protein metabolism in ripening and dormant seed and fruits*, în W. Ruhland, *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, **VIII**, 581 (1958).
14. C. E. Danielsson, Svensk. Kem. tid., **64**, 43 (1952).
15. V. Gheție, *Lucrare de dizertație*, București, 1958.
16. I. I. Gofman, I. A. Veintraub, Biohimiia, **25**, 1049 (1960).
17. C. E. Danielsson, Acta Chem. Scand., **6**, 149 (1952).
18. L. Buzilă, *Symposium on Mutational Process*, Prague, 1965.
19. L. Buzilă, Rev. roum. biochim., (sub tipar).
20. J. Kloz, V. Turkova, Biol. plant. (Praha), **5**, 29 (1963).
21. V. Gheție, L. Buzilă, Biol. plant. (Praha), **6**, 202 (1964).
22. R. Wollgiehn, Flora, **148**, 479 (1960).
23. R. K. Morton, B. A. Palk, J. K. Raison, Biochem. J., **91**, 522 (1964).
24. I. D. Raacke, Biochem. J., **66**, 101 (1957).
25. I. D. Raacke, Biochem. J., **66**, 110 (1957).
26. I. D. Raacke, Biochem. J., **66**, 113 (1957).
27. B. P. Brand, P. Johnson, Trans. Faraday Soc., **52**, 438 (1956).
28. I. A. Weintraub, I. I. Gofman, Biohimiia, **26**, 13 (1961).
29. D. R. Grant, J. M. Lawrence, Arch. Biochem. Biophys., **158**, 552 (1964).
30. J. Kloz, V. Turkova, E. Klozova, Biol. plant. (Praha), **8**, 164 (1966).
31. R. D. Cahn, N. O. Kaplan, L. Levine, E. Zwilling, Science, **136**, 962 (1962).
32. A. V. Blagovescenski, G. Aleksandrova, Tr. Glavn. Bot. Sada, **8**, 8 (1961).
33. E. V. Kolobkova, Tr. Glavn. Bot. Sada, **7**, 105 (1957).
34. S. M. Sokolova, Biul. Mosk. obsci. Izpit. Prirod., **67**, 145 (1962).
35. A. C. Jennings, R. K. Morton, B. A. Palk, Austr. J. Biol. Sci., **16**, 366 (1963).
36. B. W. Bagley, J. H. Cherry, M. L. Rollins, A. M. Altschul, Amer. J. Bot., **50**, 523 (1963).
37. J. S. Graham, R. K. Morton, Austr. J. Biol. Sci., **16**, 357 (1963).
38. A. C. Jenings, R. K. Morton, Austr. J. Biol. Sci., **16**, 384 (1963).
39. R. K. Morton, J. K. Raison, J. R. Smeaton, Biochem. J., **91**, 539 (1964).
40. R. K. Morton, J. K. Raison, Nature, **200**, 429 (1963).
41. R. K. Morton, J. K. Raison, Biochem. J., **91**, 528 (1964).
42. J. S. Graham, R. K. Morton, J. K. Raison, Austr. J. Biol. Sci., **17**, 102 (1964).
43. J. S. Graham, A. C. Jennings, R. K. Morton, B. A. Palk, J. K. Raison, Nature, **196**, 967 (1962).
44. A. M. Altschul, J. E. Snowden, D. D. Manchon, J. M. Pechary, Arch. Biochem. Biophys., **95**, 402 (1961).
45. J. E. Varner, G. Schidlovsky, Plant Physiol., **38**, 139 (1963).
46. A. C. Jennings, R. K. Morton, Austr. J. Biol. Sci., **16**, 384 (1963).
47. P. O. D. TS'O, J. Bonner, I. Vinogradov, J. Biophys. Biochem. Cytol., **2**, 451 (1956).
48. L. Dure, L. Waters, Science, **147**, 410 (1965).
49. D. Bishop, Nature, **191**, 1365 (1961).
50. E. Repers, Biochim. Biophys. Acta, **76**, 293 (1963).
51. M. Revel, H. H. Hiatt, Proc. Nat. Acad. Sci., **51**, 810 (1964).
52. Matsushita Setsuro, Mem. Res. Inst. Food Sci. Kyoto Univ., **19**, 1 (1959).
53. D. R. Brown, J. D. Caston, Develop. Biol., **5**, 412 (1962).
54. J. Bonner, R. C. Huang, R. V. Gilden, Proc. Nat. Acad. Sci., **50**, 893 (1963).
55. R. C. Huang, J. Bonner, Proc. Nat. Acad. Sci., **48**, 1216 (1962).
56. J. Bonner, R. C. Huang, N. Maheshwari, Indian J. Plant. Physiol., **5**, 247 (1962).
57. F. W. Martin, E. Waszczenko-Zacharczenko, W. C. Boyd, K. F. Schertz, Ann. Bot., **28**, 319 (1964).

ST. CERC. BIOCHIM., 9, 3, 325–335 (1966)

COMPORTAREA ENZIMELOR SERICE SUB ACȚIUNEA UNOR MĂSURI TERAPEUTICE ÎN HEPATITA CRONICĂ*. BAZELE FIZIOPATOLOGICE ȘI LIMITELE INTERPRETĂRII MODIFICĂRILOR ENZIMATICE

O. FODOR, F. BARBARINO, D. GRIGORAȘ, A. NICOARĂ și S. COTUL

577.15 : 611.018

Polimorfismul clinic, biologic și histopatologic al hepatitei cronice și varietățile evoluției sale spontane fac dificilă aprecierea eficienței măsurilor terapeutice. La aceasta contribuie și lipsa unor probe funcționale care să fie în același timp sensibile, specifice organului și leziunilor morfologice și selective pentru diferențierea bolilor.

Importanța enzimelor a fost exprimată încă din 1911 de către Wilstädter: „Viața este interacțiunea reglată a proceselor enzimatice". Warburg (1935) a semnalat în condiții patologice apariția în ser a unor enzime care sînt constituenți fundamentali ai celulelor și a pus la punct metoda optică de apreciere a activității lor. Wroblewski și La Due (1955) au subliniat semnificația *diagnostică* a activității serice a enzimelor în patologia hepatică și cardiacă. Fauvert (1960) le-a utilizat, alături de alte teste biochimice, la conturarea sindroamelor *fiziopatologice* hepatice. De atunci, o serie de cercetări experimentale și clinice au dezvoltat enzimologia, „ noua ramură de cercetare a biochimiei celulare, prin care cunoștințele noastre în legătură cu problemele clinice și diagnostice, parte și cele terapeutice, ridicate de bolile hepatice, sînt vizibil lărgite, chiar modificate fundamental" [53].

Mai recent s-a acordat modificărilor enzimatice și o semnificație *patogenetică*. S-a postulat ipoteza că după aparenta vindecare clinică și histopatologică a hepatitei acute ar persista tulburările funcționale ale sistemelor enzimatice, și consecutiv acestora procese metabolice patologice. Astfel s-ar induce progresarea autoîntreținută a hepatitei cronice, eventual prin mecanism imunologic [7].

Investigarea dinamică a modificărilor enzimatice informează despre eficiența măsurilor *terapeutice* aplicate. Analizăm comportarea enzimelor sub acțiunea extractelor hepatice, a corticosteroizilor și a asparaginei, administrate bolnavilor cu hepatită cronică și animalelor de experiență intoxicate cu tetraclorură de carbon.

Pentru a *interpreta* corect indicatorii enzimatici, trebuie să avem în vedere limitele impuse de *tehnicile de determinare* și de *particularitățile fiziopatologice* ale enzimelor.

Metodele obișnuite de cercetare din enzimologia clinică se bazează pe aprecierea activității lor biologice (cantitatea de substrat transformată în unitatea de timp). Ori, între *cantitatea* enzimelor serice și *activitatea* lor, nu există o corespondență strînsă.

Enzimele sînt foarte sensibile față de factorii *exogeni* (condițiile de recoltare și determinare), care influențează starea lor funcțională. Cantitatea și însușirile enzimelor depind totodată de factori *endogeni*: organul și organitul din care provin (izoenzime), bogăția activității enzimatice a organului, capacitatea de a resintetiza enzimele pierdute, felul, gravitatea și extinderea leziunilor histopatologice, ritmul trecerii prin membrana celulară, volumul de repartizare în lichidul extracelular, prezența unor activatori sau inactivatori enzimatici (anticorpi etc.) și viteza eliminării din circulație [1][33][46].

* Raport la Simpozionul „Medicamente și Enzime", Cluj, 26–27 noiembrie 1965.

Aceşti factori trebuie luaţi în considerare de fiecare dată cînd ne adresăm activităţii enzimatice în vederea stabilirii diagnosticului, prognosticului şi eficienţei terapeutice.

FACTORII CARE INFLUENŢEAZĂ ACTIVITATEA ENZIMATICĂ

A. *Specificitatea de organ* (constelaţia enzimatică).

B. *Specificitatea de sector celular* (hepatocit, celule Kupffer, căi biliare).

C. *Repartizarea în organite.*

I. *Nucleu* ADN → informaţia genetică → sinteza enzimelor

1) Extracte hepatice ↑ mutaţii în gene → *enzimopatiile*

II. *Reticulul endoplasmatic* → sinteza albuminei, a enzimelor de „secreţie" conjugările

2) Corticosteroizi ↑ distrofiile → *sindromul hepatopriv*

III. *Mitocondrii şi citoplasma*: enzimele „indicatoare"

3) Asparagină ↗ inflamaţia seroasă → *sindromul de hepatocitoliză*

A. Enzimele cercetate în cursul bolilor hepatice sînt numai în parte *specifice organului.* Mai mult decît enzimele izolate, este specifică organului *constelaţia enzimatică* (compoziţia şi proporţia activităţii diferitelor enzime). Aceasta se modifică suficient de caracteristic pentru unele *boli* [33][46][40], dar şi în urma *adaptării* sintezei enzimelor la anumite condiţii (fiziologice sau patologice). Manifestările clinice şi biochimice enzimatice apar astfel abia după falimentul mecanismelor de adaptare, ceea ce limitează valoarea lor diagnostică [27].

B. Specificitatea de organ este completată prin specificitatea faţă de diferitele *sectoare celulare* care compun ficatul: 80% sînt enzime hepatocitare, 16% în celulele Kupffer (insuficient studiate), 4% în restul mezenchimului şi în căile biliare. De aceasta trebuie să ţinem socoteală la alegerea enzimelor cercetate pentru precizarea *localizării* leziunilor hepatice şi a sectorului tisular asupra căruia acţionează măsurile terapeutice aplicate.

— Activitatea serică a enzimelor *de excreţie* (fosfataza alcalină şi leucin-amino-peptidaza) informează despre efectul factorilor nocivi sau terapeutici asupra *eliminării biliare* [51][46][40].

— Histoenzimele, coroborate cu aspectul histopatologic, permit aprecierea dinamică a *hiperplaziei mezenchimului.* Astfel s-a constatat că metilprednisolonul, administrat concomitent cu tetraclorura de carbon, *nu împiedică transformarea conjunctivă* a ţesutului hepatic (fosfataza acidă creşte). Aplicat după intoxicaţie, el favorizează *retrocedarea* ţesutului conjunctiv proliferat (fosfataza acidă şi alcalină sînt negative) [10] [39] [38]. Glicocorticoizii reduc reacţia mezenchimală nespecifică (normalizează impulsurile care apreciază includerea ^{35}S în ţesutul hepatic incubat [23]. Ei inhibă sinteza proteinelor fibroase (a colagenului şi elastinei) şi proliferarea celulelor conjunctive (scade conţinutul în hidroxiprolină şi hexozamină în ţesutul fibros, se reduce încorporarea de glicină-^{14}C şi ^{15}N în culturile de ţesuturi şi conţinutul în ADN al celulelor mezenchimale [24].

C. Repartizarea enzimelor în *organitele celulare* [33] [53] [40] [46] este specifică hepatocitului, dar diferă după *specie* (oglindind deosebirile de metabolism). Aceste deosebiri limitează transpunerea la om a constatărilor făcute pe animalele de experienţă.

*

I. Dintre constituenţii hepatocitului, *nucleul* este sediul ADN cromozomial, care deţine *informaţia genetică* şi o transmite la nivelul granulelor lui Palade. Aici are loc sinteza albuminei şi a *enzimelor de „secreţie"* : factorii de coagulare, ceruloplasmina, colinesteraza etc. [30] [47]]52] cu mare specificitate pentru hepatocit, care îşi exercită funcţia specifică în plasmă [40].

În urma *mutaţiilor în genă* se pot înlătura unele informaţii şi astfel încetează sinteza anumitor fracţiuni proteinice. În lipsa lor iau naştere *enzimopatiile* (galactosemia, glicogenoza, intoleranţa la fructoză, oligofrenia fenil-piruvică, boala Wilson, porfiriile) şi hepatopatiile monofuncţionale (analbuminemia, icterul Criggler-Najjar, sindromul Dubin-Johnson şi Rotor). Studiul enzimelor a clarificat mecanismul patogenetic al acestor „experimente nereproductibile ale naturii", fără să aducă însă deocamdată o contribuţie terapeutică mulţumitoare]53].

II. În afară de carenţa lor înăscută, enzimele din reticulul endoplasmic pot fi sintetizate deficitar şi în unele hepatopatii *dobîndite*, cu *distrofie* parenchimatoasă. În aceste cazuri, în afară de diminuarea enzimelor „de secreţie", se manifestă şi insuficienţa funcţională a unor enzime strîns fixate în organit, care nu se elimină în ser nici în condiţii patologice [57]. Pe acestea le apreciem indirect, prin rezultatul activităţii lor : reglarea glicemiei (glucozo-6-fosfataza), conjugarea bilirubinei (glicuronil-transferaza etc.) şi a BSF (glutation-transferaza), inactivarea hormonilor, esterificarea colesterolului, detoxicările (eliminarea acidului benzoic sub formă de acid hipuric prin urină). Insuficienţa funcţională a enzimelor din reticulul edoplasmic conturează *sindromul biologic hepatopriv.* Investigarea lor în cursul tratamentelor verifică efectul medicaţiei asupra retrocedării distrofiei hepatocitare sau favorizarea regenerării parenchimului.

Redăm unele date privind modificarea enzimelor din reticolul endoplasmic în cursul administrării de : 1) extracte hepatice, 2) corticosteroizi, 3) asparagină.

1) *Aplicarea terapeutică a extractelor hepatice* (documentată de Noelle în 1935) influenţează favorabil *evoluţia hepatitei* acute, cronice şi a cirozei hepatice [29]]53] [45] [48]. Se preferă în general extractul apos (Ripasonul), deoarece în cursul preparării hidrolizatelor intervin temperaturi înalte şi acizi care ar distruge parţial substanţele active.

Prin cercetări experimentale s-a demonstrat acţiunea extractelor hepatice administrate *protector*, înaintea tetraclorurii de carbon, sau *terapeutic*, la intervale variate după începerea intoxicaţiei. Într-un studiu efectuat de un colectiv din Clinica a III-a medicală [19] s-a evidenţiat influenţa favorabilă a extractului apos hepatic (Ripason) asupra proceselor enzimatice din cadrul sindromului hepatopriv : *sinteza albuminei şi a protrombinei* [48] [27] [56]. Nu s-au constatat deosebiri semnificative la examenul histopatologic, deşi *durata de supravieţuire* mult mai lungă a animalelor tratate cu Ripason implică menţinerea capacităţii funcţionale hepatice (tabela 1).

Tabela 1

Efectul extractelor hepatice asupra hepatitei toxice experimentale

Componenta	Cl_4C (0,2 ml per os 2x/săpt., 8 luni)	Cl_4C + Ripason (0,3 ml/kg/3x/săpt.)
Albumină (g% ser)	3,24	4,23
S. Quick (s)	61(17—20)	9(7—12)
Supravieţuire (săpt.)	6	32

Alţi cercetători verifică efectul extractelor apoase hepatice prin ameliorarea *epuraţiei BSF*, [37] [48] [34]. Diminuarea retenţiei serie a BSF atestă acţiunea Ripasonului asupra enzimelor conjugatoare din reticulul endoplasmic. Corespunzător influenţării enzimelor hepatocitare, s-au constatat histopatologic leziuni distrofico-necrotice mai rare şi mai uşoare la animalele protejate sau tratate cu extracte hepatice. Acestea retrocedează rapid după intoxicaţia

acută. În cursul experimentului cronic se dezvoltă o regenerare hepatică pronunţată (la 66—80% din animalele protejate) şi este frînată proliferarea conjunctivă [48].

Histochimic regenerarea este atestată de persistenţa ARN în citoplasmă şi a grupărilor SH în parenchim. Acestea sînt mult scăzute sau absente la animalele intoxicate fără protejare cu extracte hepatice, la care în parenchim apar substanţe PAS pozitive, produşi degenerativi mucopolizaharidici [37].

Stimularea regenerării, ca şi efectul lipotrop al extractelor hepatice, s-ar datori corpilor purinici şi grupărilor SH libere [37], evidenţiate în cantitate mare în Ripason, şi nu grupărilor SH din metionină, a căror eliberare ar necesita efort, eventual nereuşit [10].

2) *Acţiunea corticosteroizilor asupra sindromului hepatopriv*:

a) *Ameliorarea proceselor din hepatocit*, care în ultimă instanţă depind de activitatea enzimelor, se manifestă prin accentuarea *sintezelor proteinice*.

Chiar în primele 5 zile de administrare a corticosteroizilor (8 tablete = 4 mg superprednol pe zi) la majoritatea bolnavilor constatăm *ameliorarea hipoalbuminemiei*, fenomen semnalat şi de alţi cercetători [26] [28] [36] (tabela 2).

Tabela 2

Efectul cortisonului asupra albuminemiei

Albuminemia (g% ser)	După superprednol	Media creşterilor
2,67±1,80	2,92±1,21	+10,40±9,8%
	0,02>P>0,01	

Imunoelectroforeza evidenţiază accentuarea arcurilor alfa$_2$-*haptoglobinei* şi a beta$_1$-*siderofilinei*, în caz că au fost mai şterse. S-a influenţat concomitent, deşi mai puţin constant şi evident, *testul Quick*.

Creşterea sintezelor proteinice se explică prin intervenţia corticosteroizilor în lanţul complex al metabolismului proteinic [4] [36] [20] [43] [25]. Ei accentuează catabolismul tisular general, măresc afluxul de aminoacizi spre ficat, transportul în celula hepatică şi încorporarea lor în microsomi. S-a documentat sporirea conţinutului în ADN şi ARN cu intensificarea sintezei proteinelor structurale şi serice, concomitent cu regenerarea celulei hepatice.

În afară de influenţarea sintezelor, corticosteroizii ameliorează metabolismul hepatic al substanţelor a căror eliminare implică conjugarea enzimatică în reticulul endoplasmic.

b) *Modificări în economia bilirubinei*: Sub acţiunea cortisonului diminuă prompt nivelul *bilirubinemiei*, atît în ce priveşte fracţiunile conjugate cît şi cea liberă (tabela 3).

Tabela 3

Efectul cortisonului asupra economiei bilirubinei

Economia bilirubinei		Media variaţiilor
Înainte de tratament	După superprednol	
Bilirubinemia 1,28±0,73	0,94±0,63 mg%	−22,18±24,71%
Bilirubinocolia (mg% bilă):		
Jendrasik 5,75±2,95	7,84±2,58	+34,35%
Eberlein 3,88	4,89	+26,04%
Glicuronizi (%) 73,68±10,56	82,63±13,81%	+15,25±14,93%

Acest efect cortisonic îl semnalăm nu numai la bilirubinemiile cu substrat hepato-celular, ci şi la cele prin obstrucţie biliară extrahepatică incompletă, dar nu l-am observat în caz de icter mecanic cu obstrucţie biliară completă.

Principalele *ipoteze* prin care se explică scăderea bilirubinemiei sînt următoarele : reducerea formării bilirubinei prin frînarea hemolizei [6] [35], favorizarea fixării pigmentului la nivelul celulei hepatice [44] [10], stimularea conjugării prin furnizarea de radicali acid glicuronic (în urma acumulării de glicogen) [8] [12] [22], prin mărimea sintezei de transglicuronidază [35], sau prin accentuarea conjugării extrahepatice [9]. Există şi constatări care argumentează pentru ameliorarea colerezei, atît în ce priveşte volumul total, cît şi concentraţia biliară. Acest efect se explică prin refacerea polarităţii celulei hepatice sau prin decomprimarea canalelor Hering, în urma reducerii edemului periportal. Fiecare din aceste efecte cortisonice este pus la îndoială de alţi cercetători [54].

Faptul că scăderea bilirubinemiei a coincis cu creşterea *bilirubinocoliei* şi cu ridicarea *procentului glicuronizilor* bilirubinei în bila hepatică argumentează pentru ameliorarea capacităţii de glicuro-conjugare a ficatului sub acţiunea cortisonului, proces dependent de enzimele reticulului endoplasmic.

c) În sprijinul acestei interpretări privind acţiunea cortizonică menţionăm modificarea concordantă a *epurației BSF* ; se reduce *retenţia serică de la 45* min (uneori chiar în a doua zi de la administrarea cortisonului), creşte concentraţia colorantului în *bila* hepatică recoltată timp de o oră şi se ridică *procentul fracţiunilor glutationo-conjugate* faţă de BSF liberă din bilă tabela 4).

Tabela 4

Efectul cortisonului asupra epurației BSF

Testarea	Epurația BSF		Media variațiilor
	Înainte de superprednol	După superprednol	
Retenţia serică BSF 45 min	22,30±11,50	17,21±9,76%	−23,20±27,93%
Conc. în bila C BSF conj.	2,35±2,54	3,44±3,49 DO	+42,12%
(n bilă (%)	40,79±15,68	57,59±6,92%	+39,50±65,80

3) *Acţiunea asparaginei* a fost verificată în tratamentul hepatitei cronice în ultimii şapte ani la clinica noastră [14—18].

Efectul terapeutic urmărit la *bolnavi* [17] constă din ameliorarea stării generale, dispariţia astheniei, creşterea în greutate, revenirea apetitului, accentuarea diurezei şi reducerea hepatomegaliei. Se constată ameliorarea *sintezei albuminei* (tabela 5).

Tabela 5

Efectul asparaginei asupra albuminemiei

Cazurile	Albumine	Globuline	A/G
23 Hepatite cr. inactive	+34%	−27,3%	+80%
6 Hepatite cr. active	+16%	−28,6%	+41%
11 Hepatite cu potenţial cirogen	agravare	− 7,5%	—

Corespunzător ameliorării funcţionale observate la bolnavi, prin cercetări *experimentale* s-au adus dovezi despre *efectul protector şi terapeutic* al asparaginei asupra leziunilor hepatice provocate de intoxicaţia cu tetraclorură de carbon.

În experimentul *acut* aspectul histologic nu diferă semnificativ, deci asparagina nu împiedică constituirea necrozei. Ea contribuie însă la refacerea ulterioară a ţesutului, încît în experimentul *cronic* distrofia şi necroza sînt mai uşoare şi tendinţa la regenerare netă [14] [18].

Durata de supravieţuire a animalelor care au primit asparagină în timpul intoxicaţiei cu Cl_4C a fost în mod semnificativ mai lungă (la iepuri durata medie de supravieţuire creşte de la 36 la 136, iar la cobai de la 76 la 128 zile).

În ce priveşte mecanismul prin care asparagina acţionează asupra hepatocitului, este verosimil că ea oferă substrat sau stimulează procesele complexe enzimatice necesare pentru *restabilirea biochimismului celular*. Ea intervine în reacţiile de transaminare care promovează reînoirea aminoacizilor în vederea *sintezelor proteinice*. Acest fapt este atestat de scăderea aminoaciduriei şi de înglobarea accentuată a metioninei—^{35}S. în proteinele tisulare în cursul tratamentului cu asparagină [17].

Acidul aspartic are un efect *amoniofixator* în hiperamoniemia spontană şi provocată a hepaticilor, prin faptul că oferă un atom N pentru urogeneză, în timp ce al doilea atom N provine din molecula de amoniac [16].

Asparagina contribuie la asigurarea nevoilor *energetice* tisulare, favorizează restabilirea proceselor de oxidaţie şi respiraţie celulară prin intermediul ciclului Krebs [5].

Efectul favorabil se observă însă numai cînd metabolismul hepatocitar este moderat şi reversibil alterat. În hepatita cronică severă, şi mai ales în ciroza hepatică, dereglarea enzimatică şi lipsa de substrat compromite în mod ireversibil procesele furnizoare de energie. În aceste condiţii, oferta de acid aspartic pentru reacţiile de transaminare şi ureogeneză nu are efectul biochimic scontat [17].

III. O altă categorie de enzime cu mare valoare diagnostică şi prognostică sînt cele *indicatoare*, care îşi exercită funcţia specifică în celula hepatică, la nivelul mitocondriilor sau în citoplasmă [53]. Dintre enzimele *mitocondriale* are valoare diagnostică deosebită *glutamat-dehidrogenaza*. Activitatea ei scade în hepatocit în cursul hepatitei acute (de la 92,42 U/g ficat normal la 40,10 U/g) [46]. Enzima apare în ser în cantităţi reduse în faza de început şi în formele uşoare de hepatită epidemică, şi creşte pronunţat în cursul leziunilor severe de distrofie şi mai ales în necrobioză. În *citoplasmă* se găsesc enzimele glicolizei (LDH, ALD), ale metabolismului fructozei (SDH, PFA), a sintezei ureei (OCT) şi unele dehidrogenaze (GDH, ADH, ZF, PGDH). Alte enzime sînt repartizate *atît în mitocondrii cît şi în citoplasmă*, în proporţie diferită după organ, specie, condiţii fiziologice şi patologice (GOT, MDH, HK, GAPDH, IDH, GPT, ENO, PK).

Enzimele „indicatoare" apar în plasmă numai în cantităţi minime, deoarece în absenţa coenzimei şi a substratului specific nu-şi pot exercita acţiunea specifică. Ele sînt *pierdute* de hepatocit cînd noxe variate (infecţii, toxice, medicamente, tulburări de circulaţie, traumatisme etc.) modifică metabolismul celular, de la stadiul biochimic cu dezechilibru energetic reversibil, pînă la necroza de coagulare. Perturbarea fenomenelor de transport şi a funcţiei de membrană a mitocondriilor şi a hepatocitului determină pierderea unor constituenţi celulari spre spaţiile Disse. *Inflamaţia seroasă* se reflectă umoral prin creşterea activităţii serice a enzimelor „indicatoare", a sideremiei şi vitaminei B_{12}, care conturează *sindromul de hepatocitoliză*. Între componentele sale există o relaţie calitativă, dar nu o concordanţă strînsă cantitativă, deoarece nivelul lor seric depinde de conţinutul celular preexistent [46].

Cu valoare diagnostică, dar mai ales prognostică şi cu aplicare la urmărirea eficienţei măsurilor terapeutice, este *dinamica* pierderilor enzimatice în cursul bolilor hepatice. Hepatocitul pierde în cursul leziunilor recente şi nu prea severe mai ales enzime din citoplasmă, unde se găseşte 89% din GPT şi numai 61% din GOT [46]. De aceea, în hepatitele acute şi în coafectarea hepatică din obstrucţia biliară recentă, ca şi în primele puseuri de acutizare din cursul hepatitei cronice, GPT depăşeşte GOT deşi în hepatocit raportul este invers (GPT = 57,32 U/gF, şi GOT = 94,65 U/gF) [46] [32] [33] [1]. Activitatea serică a enzimelor hepatice creşte la

început în contul celor din citoplasmă, totuşi cencentraţia lor nu scade la acest nivel, ci în mitocondrii, deoarece se produce o redistribuire intracelulară. Mitocondriile pierd o parte din echipamentul lor enzimatic, al căror raport scade faţă de citoplasmă, chiar şi pentru enzimele a căror cantitate globală din hepatocit nu se modifică (GOT, LDH, GAPDH, PK). Cînd apar în ser şi enzime mitocondriale, este semn de leziune hepatocitară mai severă şi de lungă durată. Astfel, în unele hepatite acute grave şi în majoritatea cirozelor hepatice se elimină şi izoenzima mitocondrială a GOT, care împreună cu izoenzima citoplasmatică depăşeşte activitatea serică a GPT şi inversează coeficientul de Ritis (GOT > GPT).

Urmărirea activităţii serice a enzimelor indicatoare ne-a permis să verificăm efectul măsurilor terapeutice asupra metabolismului hepatocitar (în special a fosforilărilor oxidative din mitocondrii), de care depinde permeabilitatea celulară. S-au explorat transaminazele GPT şi GOT (metoda Bruyet, micromoli/ml/oră şi OCT (metoda Ballan-Demange, gama N/ml/oră).

1) *Extractele hepatice* administrate în cursul intoxicaţiei cronice experimentale cu tetraclorură de carbon au redus activitatea serică a transaminazelor [19] (tabela 6).

Tabela 6

Efectul extractelor hepatice asupra GPT

Testarea	Cl_4C	Cl_4C + Ripason
GPT(M/ml/oră)	3,76	2,37

2) Administrarea de scurtă durată a *corticosteroizilor* (4 mg superprednol timp de 5 zile) la bolnavi cu hepatită cronică realizează de asemenea scăderea promptă şi puternic semnificativă statistic a transaminazelor serice ($P < 0,01$) (tabela 7).

Tabela 7

Efectul cortisonului asupra transaminazelor

Testarea	Transaminazele		Media scăderilor
	Înainte de tratament	După superprednol	
GPT	4,48±1,81	2,71±1,28 M/ml/oră	−33,10±23,70%
GOT	3,47±1,72	1,98±1,41 M/ml/oră	−32,71±17,35%

Cîteva cazuri fac excepţie de la efectul favorabil al corticosteroizilor. Dintre acestea, numai în două cazuri bilirubinemia a crescut concomitent cu transaminazele şi s-a redus conjugarea şi eliminarea biliară a BSF. Această *agravare* a indicilor umorali o putem explica prin suprasolicitarea celulei hepatice (aflată în stare metabolică vulnerabilă) pentru glicuronoeterificarea cortisonului, cu distrugerea şi eliminarea întîrziată a hormonului (ai cărui produşi de degradare au efect nociv [3] [33]. Ar putea fi vorba şi de frînarea conjugării bilirubinei şi BSF prin *efect competitiv* de către cortison [2], fără să fie deci necesar să admitem accentuarea suferinţei hepatice. Totodată, considerăm posibilă creşterea activităţii transaminazelor serice şi prin *stimularea sintezei* în hepatocit, cu pierderea lor în continuare, pe durata permeabilităţii celulare încă insuficient corectată. Această ultimă interpretare o susţinem pentru cazurile la care activitatea transaminazelor s-a accentuat în mod trecător în ser şi discordant cu îmbunătăţirea stării generale şi a unor indici umorali dependenţi de acţiuni enzimatice (cum este ameliorarea albuminemiei, a testului Quick şi a conjugării bilirubinei şi BSF). S-a constatat creşterea conţinutului de GOT şi GPT în hepatocit după administrare de glicocorticoizi [21]

[31] [42] [49]. Nu este vorba de conservarea enzimelor celulare, ci de accentuarea sintezei, demonstrată experimental [25]. Pare că cortisonul acţionează ca inductor sau corepresor al genelor operatoare din hepatocit. Prin aceasta sînt stimulate genele structurale de care depinde sinteza lanţurilor de enzime în corelaţie funcţională [25].

3) *Asparagina*, administrată *bolnavilor* cu hepatită cronică, a redus activitatea GPT seric doar la 3/4 din cazuri (de la $\bar{x} = 4,76$ la $\bar{x} = 3,63$ micromoli/ml/oră)[17].

Creşterile trecătoare ale activităţii transaminazice în ser ar putea rezulta din administrarea acidului aspartic care este substratul reacţiei catalizate de GOT. Totodată, asocierea vitaminei B_6 (piridoxal-5-fosfat) oferă cofermentul activator al transaminărilor catalizate de GPT şi GOT [1] [46].

În condiţii *experimentale* s-a urmărit acţiunea asparaginei asupra enzimelor serice şi tisulare, în cursul intoxicaţiei cu tetraclorură de carbon [18]. În timp ce în ser activitatea transaminazelor creşte, ea scade în ţesutul hepatic. În ambele sectoare, modificările sînt mult mai pronunţate la animalele intoxicate, fără administrare concomitentă de asparagină (tabela 8).

Tabela 8

Efectul asparaginei asupra transaminazelor

Enzimele serice (iepuri martori)	Cl_4C (0,2 ml/kg la 3 zile, 5 săpt.)	Cl_4C + asparagină (1 ml/kg sol. 2,5%i.v.)
GPT $\bar{x}=2,30(1,25-3,65)$	$\bar{x}=11,20(7-16,50)$	$\bar{x}=6,02(3,90-9)$
GOT $\bar{x}=1,40(0,50-2,25)$	$\bar{x}=4,65(2,95-7,50)$	$\bar{x}=2,62(0,75-4,75)$
OCT $\bar{x}=4,20(0,30-5,40)$	$\bar{x}=13,66(11-18)$	$\bar{x}=4,96(3,50-9)$
Enzimele tisulare (iepuri martori)	la intoxicaţi	Cl_4C+ asparagină
GPT $\bar{x}=1234$	$\bar{x}=514-468$	$\bar{x}=1024-672$
GOT $\bar{x}=1230$	$\bar{x}=942-657$	$\bar{x}=1084-823$
OCT $\bar{x}=3807$	$\bar{x}=362-571$	$\bar{x}=1001-842$

Urmărirea *dinamică* a curbei modificărilor enzimatice din *ser* arată tendinţa de normalizare a transaminazelor în cursul tratamentului cu asparagină, în timp ce la animalele intoxicate fără această protecţie activitatea enzimelor serice este, după o lună, încă aproape de trei ori mai mare (tabela 9).

Tabela 9

Dinamica acţiunii asparaginei asupra transaminazelor

Martori	Săpt. I	Săpt. II	Săpt. III	Săpt. IV
GPT 1,65–2	Intoxicaţi 60,5(41–80)	11(10–12)	6,77(5,5–8)	6,87(4,25–7,5)
	Trataţi 35(30–40)	6,67(5,75–7,50)	6,75(4,25–7,25)	2,87(2,25–3,50)
GOT 1–1,25	Intoxicaţi 27(20–34)	7,75(5,5–9)	2,9(2,65–3,15)	5,86(2,5–8,2)
	Trataţi 16,5(13–20)	3,82(2,75 –4,9)	2,65(2,5–2,8)	2(1,25–2,75)

Gradientul hepato-seric al enzimelor evidenţiază de asemenea influenţa favorabilă a tratamentului asparaginic în cursul intoxicaţiei cu Cl_4C. Efectul asparaginei se manifestă însă abea după o lună (tabela 10).

Tabela 10

Gradientul hepato-seric sub acţiunea asparaginei

Martori	Săptămîna I		La sacrificare (1 lună)	
	Cl_4C	Cl_4C + asparagină	Cl_4C	Cl_4C + asparagină
GPT				
$\frac{1324}{1,60} = 828$	$\frac{196}{65} = 3$	$\frac{166}{58,7} = 2,8$	$\frac{468}{6,87} = 68$	$\frac{672}{2,87} = 234$
GOT				
$\frac{1230}{1,50} = 820$	$\frac{525}{101} = 5,2$	$\frac{267}{38,7} = 6,9$	$\frac{657}{5,85} = 112$	$\frac{823}{2} = 411$
OCT				
$\frac{3807}{3,07} = 1240$	$\frac{405}{22} = 18,4$	$\frac{415}{40} = 10$	$\frac{571}{7} = 81,5$	$\frac{842}{8,20} = 105$

Apariţia întîrziată a efectului asparaginei asupra modificărilor histopatologice şi enzimatice în cursul hepatitei toxice experimentale are aplicare în clinică. Ea ne explică de ce trebuie să aşteptăm uneori 2—3 săptămîni pînă la ameliorarea testelor umorale la bolnavii cu hepatită cronică trataţi cu asparagină.

CONCLUZII

În ce priveşte influenţarea terapeutică a conţinutului enzimatic seric de origine hepatocitară putem aduce unele date ce rezultă din investigaţiile noastre clinice şi experimentale, privind modificările lor sub administrarea de extracte apoase hepatice, corticosteroizi şi asparagină.

1. *Extractele apoase hepatice* (ripasonul) accentuează sinteza albuminei şi a protrombinei, ameliorează eliminarea BSF şi reduc activitatea serică a transaminazelor.

2. *Corticosteroizii* (superprednolul) corectează hipoalbuminemia şi timpul Quick, ameliorează eliminarea bilirubinei şi BSF, cu ridicarea procentului fracţiunilor conjugate în bila hepatică, şi micşorează de obicei activitatea serică a transaminazelor.

3. *Asparagina* ameliorează sinteza albuminei, corectează gradientul hepato-seric al transaminazelor şi OCT.

4. Faptul că se ameliorează mai multe procese metabolice, atît cele din reticulul endoplasmic (sinteza albuminei, protrombinei, conjugarea bilirubinei şi a BSF) cît şi cele care condiţionează permeabilitatea de membrană (cu conservarea transaminazelor şi OCT), ne permite să deducem că aceste efecte sînt realizate prin accentuarea activităţii enzimatice în hepatocit. Este verosimil că se stimulează sintezele enzimatice.

Prezentat la redacţie la 20 ianuarie 1966

Clinica a III-a medicală
I.M.F., Cluj

BIBLIOGRAFIE

1. Amelung J., *Fermentdiagnostik innerer Erkrankungen*, G. Thieme, Stuttgart, 1964.
2. Arias J. M., Johnson L., Wolfson D., *Biliary excretion of injected conjugated and unconjugated bilirubin by rate*, Amer. J. Physiol., **200**, 1991 (1961).
3. Bassler E., *Lebernekrosen und Steroidtherapie*, Acta Hep. Splenol., **9**, 23 (1962).
4. Benetato Gr., *Despre rolul glandelor corticosuprarenale în metabolismul proteinelor*, St. cerc. fiziol., **4**, 281 (1951).
5. Bra-Unstein A., cit. de Fodor O. şi colab. [15].
6. Brunetti M., Ferrera U., Grampi C., *Modificazioni delle resistenze globulari osmotiche indotte dai cortisonici*, Minerva medica **54**, 1001 (1963).
7. Dan S., Bobory J., Deveny I., *Über die Bedeutung von Enzym-Untersuchungen bei Krankheiten der Leber*, Acta Hepato-Splenol., **1**, 50 (1963).
8. Ditoro R., Fabro S., cit. de Murano G. şi colab. [35].
9. O'Donnel J. F., Mistilis S. F., Schiff L, Cobb T, *The effect of steroids on bilirubin clearance*, Gastroenterol., **44**, 476 (1963).
10. Eger W., cit. de Papacharalampous [37].
11. Eger W., Nassz-Esfahani H., *Beiträge zum therapeutischen Einfluss von Cortison auf Erkrankungen der Leber und der Gallenwege*, Med. Welt, **35**, 1822 (1964).
12. Ferrari V., Auricchio S., Martucci E., cit. de Sereni şi colab. [44].
13. Fischer A., Takacs L., Várga S., *Zur Frage der Stimulierung der Leberregeneration*, Acta Hepato-Splenol., **2**, 89 (1964).
14. Fodor O., Abel C., Ban A., *L'effet protecteur de l'acide aspartique sur les lésions hépatiques expérimentales*, Rev. Int. Hépatol., **8**, 611 (1957).
15. Fodor O., Abel Ch., Manasia M., Szantay I., *L'effet thérapeutique de l'acide aspartique dans les affections hépatiques*, Rev. Int. Hépatol., **9**, 211 (1959).
16. Fodor O., Borda M., Manasia M., Szantay I., *Recherches sur l'action ammonio-fixative de l'acide aspartique dans les affections hépatiques*, Rev. Int. Hépatol., **6**, 895 (1960).
17. Fodor O., Surianu P., Tragor S., Cotul S., *Noi verificări clinice, biochimice cu privire la acţiunea terapeutică a acidului aspartic în hepatitele cronice*, St. cerc. med. Cluj, **1**, 181 (1963).
18. Fodor O., Părău N., Calu C., Ban A., *Date noi asupra acţiunii protectoare a acidului aspartic în hepatita toxică experimentală, apreciate prin determinarea enzimelor serice şi tisulare ale ficatului*, Med. int., **7**, 795 (1965).
19. Fodor O., Baciu Z., Horaţiu C., Urcan S., Ban A., *Efectul protector al extractelor hepatice asupra leziunii hepatice experimentale cu tetraclorură de carbon*, St. cerc. med. Cluj, **2**, 335 (1963).
20. Gajdos A., *Foie et hormones corticostéroïdes*, Sem. Hôp., **5**, 127 (1955).
21. Gavosto F., Pileri A., Brusca A., *Ulteriore ricerche sull'azione del cortisone sulla transaminasi epatiche*, Biochim. biophys. Acta, **24**, 250 (1957).
22. Greengard O., Weber C., Singhal R. L., *Glycogen deposition in the liver induced by cortison*, Science, **141**, 160 (1963).
23. Hauss W. H., Hulsing G. Y., Manitz G., Honig F., *Über die Aktivität des Mesenchimstoffwechsels bei krankhaften Prozessen in der Leber*, Dtsch. Med. Wschr., **88**, 811 (1963)
24. Hirayama C, Fukuda T., Tominaga K., Tada H., Masoya T., *Metabolism of fibrous protein in the liver*, Acta Hep. Splenol., **10**, 154 (1963).
25. Hubener H. I., *Die physiologische Funktion bei Nebennierenrindenhormone als Enzym Induktoren*, Dtsch. Med. Wschr., **9**, 438 (1962).
26. Jahteva A. M., *Hroniceskie ghepatiti kak ishod bolezni Botkina i lecenie i prednizolonum*, Terap. Arhiv, **35**, 23 (1963).
27. Jasinski B., *Der Eiweiss-Eisenstoffwechsel und das Verhalten der Enzyme, der Vitamin B_{12} und anderer Wirkstoffe bei Erkrankungen der Leber*, Schw. Med. Wschr., **20**, 601 (1962).
28. Jerebtov L. A., *Steroidnaia terapiia hroniceskii zabolevanii peceni i levliianiena videlnie 17 ketosteroidov*, Sov. Med., **26**, 30 (1963).
29. Kalk H., Wildhirt E., cit. de Papacharalampous [37].
30. Lang W., *Serumcholinesterase und Leberkrankheiten* Münch. Med. Wschr., **105**, 1598 (1963).
31. La Croix E., Leusen I., *Influence of cortisone on some enzyme systems in the heart and liver*, Med. Surg., **17**, 170 (1959).
32. Leipord H., Wust H., Schon H., *Bedeutung und Grenzen der quantitativen Fermentdiagnostik in Serum*, Dtsch. Med. Wschr., **28**, 1341 (1961).

33. Lindner H., *Der praktische Wert der Enzymdiagnostiken den Erkrankungen der Leber und der Gallenwege*, Internist. Prax., **5**, 213 (1965).
34. Magyar J., Richter R., Balazs M., Vecsei A., Ban J., *Über die Wirkung von wässrigen Leberextrakt und Leberhydrolysat bei mit Tetrachlorkohlenstoff vergifteten Ratten*, Acta Hep. Splenol., **5**, 265 (1964).
35. Murano G., *Alcune ricerche sull'azione ipobilirubinemizzante dell prednisolone idrosolubile sulla diagnostica dell'iltero patologico del neonato*, Il Fegato, **8**, 247 (1962).
36. Nicolaescu T., Gabrielescu E., Ghizari E., Stoiculescu P., Bittman E., *Aspecte ale metabolismului protidic al ficatului în cursul regenerării din hepatitele cronice*, Med. Int., **7**, 199 (1965).
37. Papacharalampous M., *Die Wirkung des Rohleberextraktes auf die durch Tetrachlorkohlenstoff geschädigkte Rattenleber*, Acta Hepato-Splenol., *1*, 27 (1964).
38. Petzold H., Zimmermann S., Schwaver Y., *Die Wirkung von 6-Methylprednisolon auf Gewebsenzyme der Tierleber bei chronischer Tetrachlorkohlenstoffschädigung*, Dtsch. Z. Verdau.-u. Stoffwechselkr., **22**, 150 (1962).
39. Popper H., Schaffner F., *Progress in Liver Diseases*, Grune-Straton, N. Y., 1961.
40. Richterich R., *Enzymdiagnostik der Leberkrankheiten*, Wien. Med. Wschr., **113**, 611 (1963) şi Schw. Med. Wschr., **38**, 1363 (1963).
41. Ritis F. de, Coltorti M., Giusti G., cit. de Schmidt [46].
42. Rosen F., Roberts N. R., Budnick L. E., Nichol A. C., *Glucosteroids and transaminase activity*, J. biol. Chem., **234**, 476 (1959).
43. Runcan V., *Probleme de hepatologie*, Edit. med., Bucureşti, 1964.
44. Sereni F., Piceni L., Perletti L., Pollonio T., Careddu P., *L'influenza dell-idrocortisone sull'escrezione della bilirubina da parte del fegato isolato e perfuso*, Minerva Med. Supl. **69**, 2554 (1964).
45. Siede W., Walther B. W., cit. de Papacharalampous [37].
46. Schmidt E., Schmidt F. W., *Untersuchungen über optimale Reaktions-Bestimmungen für Enzymaktivitätsbestimmungen. Enzym-Bestimmungen in Serum bei Leber-Erkrankungen. Das Verteilungs-Muster einiger Enzyme in der menschlichen Leber und seine Veränderungen unter der Zell-Schädigung*, Enzimol., 1, *3*, 73 şi 201 (1962/63).
47. Stefenelli N., Wewalka F., *Die klinische Bedeutung der Aktivitätsbestimmung der Serumcholinesterase*, Acta Hepato-Splenol., **6**, 379 (1961).
48. Stiefel G. E., Jasinski B., *Indikationen und Wirkungen der Leberextraktes Ripason*, Praxis, **52**, 367 (1963).
49. Tenconi L. T., *Attivita transaminasiche del fegate durante la gliconeogenesi da prednisone*, Acta vitamin., **12**, 73 (1958).
51. Wa-Chstein M., *Enzymatic histochemistry of the liver*, Gastroenterol., **37**, 523 (1959).
52. Weideman H., Med. Klin., *Die Serumcholinesteraseaktivität beim Leberparenchimschäden*, Med. Klin., **44**, 1795 (1963).
53. Wildhirt E., *Fermentstoffwechsel der Leber*, Wien. klin. Wschr., **10**, 162 (1962).
54. Williams R., Billing B., *Action of steroids therapy in jaundice*, Lancet, **7199**, 392 (1961).

„Studii şi cercetări de biochimie" publică articole originale de nivel ştiinţific superior, din toate domeniile biochimiei. Sumarele revistei sînt completate cu alte rubrici, ca : *Viaţa ştiinţifică*, în care prin scurte note, sînt aduse la cunoştinţă cititorilor unele manifestări ştiinţifice din domeniul biochimiei : congrese, simpozioane, consfătuiri, schimburi de experienţă între cercetătorii români şi cei străini etc. ; *Recenzii* — în care sînt prezentate cele mai recente lucrări de specialitate apărute în ţară şi peste hotare.

NOTĂ CĂTRE AUTORI

Autorii sînt rugaţi să înainteze articolele, notele şi recenziile dactilografiate la două rînduri. Tabelele vor fi dactilografiate pe pagini separate, iar diagramele vor fi executate în tuş, pe hîrtie de calc. Tabelele şi ilustraţiile vor fi numerotate cu cifre rabe. Figurile din planşe vor fi numerotate în continuarea celor din text. Se va evita repetarea aceloraşi date în text, tabele şi grafice. Explicaţia figurilor va fi dactilografiată pe pagină separată. Citarea bibliografiei în text se va face în ordinea numerelor. Numele autorilor va fi precedat de iniţiale. Titlurile revistelor citate în bibliografie vor fi prescurtate conform uzanţelor internaţionale.

Autorii au dreptul la un număr de 50 de extrase, gratuit.

Responsabilitatea asupra conţinutului articolelor revine în exclusivitate autorilor.

Corespondenţa privind manuscrisele, schimbul de publicaţii etc. se va trimite pe adresa Comitetului de redacţie : str. Docenţilor nr. 20, Bucureşti 2, Raionul 30 Decembrie.

AUG 3 11

Lucrări apărute în Editura Academiei Republicii Socialiste România

IONEL HAIDUC, **Introducere în chimia ciclurilor anorganice**, 339 p., 16 lei.

C. D. NENIŢESCU, I. P. CANTUNIARI şi I. G. DINULESCU, **Nomenclatura chimiei organice**, 96 p., 3,65 lei.

ILIE VASILESCU, **Enzimele**, 429 p., 22,80 lei.

R. PORTOCALĂ şi N. I. IONESCU, **Microscopia electronică în biologie şi inframicrobiologie**, 180 p., 9,90 lei.

C. VELICAN, DOINA VELICAN şi N. CARP, **Histochimia mucopolizaharidelor**, 284 p. + 24 pl., 20 lei.

C. BODEA şi colab., **Tratat de biochimie vegetală**, vol. I, 747 p. + 4 pl. + 2 pl. color, 41 lei.

I. CANTACUZINO, **Opere alese**, 687 p. + 4 pl. color, 44 lei.

ST. CERC. BIOCHIMIE, TOMUL 9, NR. 3, P. 229 — 336, BUCUREŞTI, IULIE 1966

I. P. Informaţia, — c. 3532

43 816

Lei 12. —

F 1330

studii şi cercetări de biochimie

4

TOMUL 9

1966

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

St. cerc. biochimie, tomul 9, nr 4, 337—392, Bucureşti, decembrie 1966

COMITETUL DE REDACȚIE

Redactor responsabil:

ACADEMICIAN E. MACOVSCHI

Redactor responsabil adjunct:

H. SLUȘANSCHI

Membri:

S. OERIU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; EUGENIA SORU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; M. MEZINCESCU; I. VASILESCU; TR. RĂDULESCU, VICTORIA ALEXANDRESCU.

Secretar de redacție:

VICTOR GHEȚIE

Revista apare de 4 ori pe an.

Prețul unui abonament anual este de 48 lei.

În țară abonamentele se fac la oficiile poștale, agențiile poștale, factorii poștali și difuzorii voluntari din întreprinderi și instituții.

Orice comandă din străinătate (numere izolate sau abonamente) se fac prin: CARTIMEX, Căsuța poștală 134—135, București, Republica Socialistă România, sau prin reprezentanții săi din străinătate.

Manuscrisele, cărțile și revistele pentru schimb, precum și orice corespondență se vor trimite pe adresa comitetului de redacție al revistei „Studii și cercetări de biochimie".

ADRESA REDACȚIEI:

București, *Str. Docenților nr. 20,*
Raionul 30 Decembrie

OROSZORSZÁGI KÖNYVTÁRES DOKUMENTÁCIÓS KÖZPONT 1963

STUDII ŞI CERCETĂRI DE
BIOCHIMIE

Tomul 9 (1966) Nr. 4

SUMAR

H. SLUŞANSCHI, Evoluţia biochimiei în ţara noastră 339

I. BRAD, V. SOTIRIU şi V. STEROIU, Contribuţii la studiul biochimiei rezistenţei la ger a cerealelor de toamnă. V. Studiul comparativ al activităţii dehidrazelor şi respiraţiei la cereale de toamnă în timpul iernii. Unele diferenţieri legate de potenţialul redox 347

V. GHEŢIE, Fluoro-imunoelectroforeza 359

D. TĂNĂSESCU, Participarea în metabolismul muscular a aminoacizilor liberi intracelulari 367

F. TOCILESCU şi E. GIOSAN, Valorile glutationului total, redus şi oxidat în sîngele arterial şi venos 377

REFERATE GENERALE

H. USCHERSOHN, Structura şi funcţia la nivelul biochimic de organizare a materiei vii 381

St. cerc. biochimie, tomul 9, nr. 4, p. 337— 390, Bucureşti, decembrie 1966

ST. CERC. BIOCHIM., 9, 4, 339–345 (1966)

EVOLUȚIA BIOCHIMIEI ÎN ȚARA NOASTRĂ

S-a împlinit la 1 aprilie al acestui an un secol de cînd a luat ființă Societatea literară română, forma primară a celui mai înalt for de cultură și știință din țara noastră, înaintașa Academiei Republicii Socialiste România.

Prilej de sărbătoare, acest centenar este nu mai puțin și prilej de aducere-aminte, de întoarcere în trecut, de reînviere a imaginii acelor bărbați de inimă care, prin strădaniile lor, au pus piatra de temelie a Academiei noastre de astăzi, ca și a acelora care, mai tîrziu, în curgerea deceniilor, au fost factorii hotărîtori ai dezvoltării pe planuri tot mai larg cuprinzătoare a științei și culturii românești. Prin rîvna lor neostenită s-au creat premisele integrării noastre în curentul mondial al progresului științei și culturii, s-au creat premisele contribuțiilor noastre la acest progres.

Lor li se datorește faptul că, plecînd de la preocupările strict filologice ale înaintașei de acum un secol, Academia noastră a putut să-și extindă treptat sfera de activitate, ajungînd să cuprindă astăzi toate domeniile de activitate științifică și culturală și să ocupe în viața țării locul hotărîtor care i se cunoaște.

Dintre acești pionieri ai dezvoltării științei și culturii noastre în ultimul secol, fie-ne îngăduit să ne amintim aici de aceia care au pus bazele biochimiei românești și au contribuit apoi la creșterea ei.

Biochimia este, după cum se știe, o ramură a științei, care s-a constituit abia în cea de-a doua jumătate a secolului al XIX-lea, ca rezultat al aplicării metodelor chimiei în domeniile fiziologiei și al biologiei în general. În țara noastră însă, primele cercetări de biochimie datează cam de pe la începutul secolului nostru. Începuturile acestei științe la noi se datoresc cîtorva cercetători români care, specializați în marile centre universitare ale Occidentului, au luptat apoi pentru organizarea învățămîntului biochimiei la noi și au reușit să întemeieze primele centre de cercetare biochimică în cadrul universităților noastre, înfruntînd cu avînt nenumăratele greutăți inerente oricărui început și zbătîndu-se să depășească, prin ingeniozitate tehnică, piedicile pe care le ridica în calea lor baza materială, cu totul precară, de care învățămîntul universitar putea dispune pe atunci.

Dar, cu toate lipsurile, unii dintre acești înaintași au reușit încă de la început să se afirme cu tărie și să creeze o operă cu ecouri pe plan mondial.

Dintre figurile de seamă ale trecutului, este drept să fie amintit ca cel dintîi dintre acești pionieri medicul-chimist *E. Riegler* (1854—1929), care, numit în 1881 profesor la catedra de chimie a Facultății de medicină din Iași, pe lîngă meritul de a fi depus o rodnică activitate în domeniul biochimiei medicale, îl are și pe acela de a fi publicat, în 1904, primul manual românesc de laborator clinic. În această lucrare sînt cuprinse o serie de metode originale, a căror valoare a fost unanim recunoscută și dintre care unele sînt folosite și astăzi, în diferite variante, în multe laboratoare din lume, de pildă determinarea colorimetrică a proteinelor pe baza reacției biuretului, determinarea acetonei urinare, a clorurilor, fosfaților, sulfaților, amoniacului, calciului din urină, identificarea indicanului urinar, a bilirubinei, albumozelor, glucozei, sărurilor de amoniu, amoniacului liber, iodului din urină etc.

În aceeași vreme, alături de *E. Riegler*, au desfășurat o valoroasă activitate în domeniul biochimiei și cunoscuții fiziologi *I. Athanasiu* (1868—1926) și *D. Călugăreanu* (1868—1937). Cel dintîi, care este unul dintre întemeietorii fiziologiei moderne românești, a manifestat în cadrul multiplelor sale preocupări un interes deosebit pentru problemele biochimiei sîngelui, în special pentru procesele coagulării și hemolizei; de asemenea a adus contribuții interesante la studiul schimburilor respiratorii la animale și a efectuat o întreagă serie de cercetări valoroase cu privire la variațiile unor componente ale ficatului, mușchilor, pielii, sistemului nervos etc. Și *D. Călugăreau* a manifestat în activitatea sa științifică mult interes pentru problemele biochimiei sîngelui, făcînd cercetări cu privire la permeabilitatea globulelor roșii, coagularea sîngelui, concentrația osmotică a sîngelui, distrugerea în splină și ficat a hematiilor îmbătrînite. De asemenea a publicat lucrări cu răsunet, rămase clasice, asupra respirației intestinale la pești. Tot lui *D. Călugăreanu* îi revine meritul de a fi inițiat, în 1908, cînd a fost numit conferențiar de „chimie fiziologică" la Universitatea din București, primul curs de acest fel din țara noastră. Este locul să amintim aici felul în care *D. Călugăreanu* definea această disciplină: „*Chimia fiziologică este o parte a marii științe cunoscute sub numele de biologie*" și care se ocupă nu numai de „. . . *studiul fizic și chimic al substanțelor ce intră în constituția materiei viețuitoare*", ci și de acela al „. . . *fenomenelor ce se produc în urma reacțiilor ce au loc între aceste substanțe adunate în celule*". Această definiție, îmbinînd procesele fizico-chimice cu cele biologice, evidențiază concepția justă, materialistă, și spiritul de cercetător progresist al lui *D. Călugăreanu*.

Mai trebuie amintit apoi printre înaintașii cercetării biochimice de la noi, care au activat în domeniul biochimiei animale, profesorul *R. Vlă-*

descu (1886—1964). Format ca biochimist la Institutul Pasteur din Paris, sub îndrumarea marelui savant *Gabriel Bertrand*, și numit mai tîrziu profesor titular la Facultatea de medicină veterinară din București (1923), inițiază aici organizarea unui laborator de chimie biologică, primul de acest fel în țară în acea vreme, unde desfășoară o bogată și fructuoasă activitate de cercetare. Aceasta cuprinde elaborarea unor noi metode de determinare cantitativă a unor componente ale lichidelor biologice și țesuturilor (fosfați, cloruri, sodiu, potasiu etc.), punerea în evidență a unor deosebiri între tipurile de metabolism caracteristice diferitelor specii de animale, precum și a unor modificări pe care compoziția lichidelor biologice (urină, lapte etc.) le suferă sub influența unor factori de mediu, apoi studiul mecanismului contracției musculare, cu formularea unei noi ipoteze cu privire la sursele energetice ale transformărilor fizico-mecanice din țesuturi, și multe altele.

Contribuții valoroase în biochimia animală au adus și alți oameni de știință români care au activat ca profesori de biochimie în învățămîntul medical. S-a remarcat astfel, de pildă, prin rezultatele cercetărilor sale *V. Ciocîlteu* (1890— 1947), cunoscut mai ales prin lucrările efectuate împreună cu *O. Folin*, care au dus la descoperirea reactivului ce le poartă numele și stă la baza uneia dintre cele mai larg utilizate metode de determinare a proteinelor.

Un moment însemnat în istoria biochimiei românești îl marchează activitatea profesorului *A. Craifăleanu* (1884— 1938), întemeietorul catedrei de chimie biologică de la Facultatea de științe a Universității din București (1932) și autor al unor deosebit de interesante lucrări. Unele dintre acestea, publicate înainte de 1920, în perioada cînd *A. Craifăleanu* conducea laboratorul de chimie biologică al Stațiunii zoologice din Neapole, se referă îndeosebi la fermenții proteolitici ai unor animale marine și la hemocianine, iar cele de mai tîrziu, elaborate în cadrul laboratorului de chimie biologică de la Facultatea de științe din București, pentru organizarea și înzestrarea căruia a luptat din greu, se referă în cea mai mare parte la compoziția chimică a sîngelui păsărilor. Dintre aceste ultime lucrări, un deosebit răsunet au avut cele privitoare la sinteza acidului uric la păsări, rezultatele obținute de *A. Craifăleanu* prin experiențe de mare ingeniozitate aducînd dovada că nu ureea este precursorul acestui acid, cum se credea pînă atunci, ci amoniacul și bioxidul de carbon, ceea ce ulterior a fost confirmat de către alți cercetători. Din păcate, o boală contractată în urma unui accident de laborator l-a doborît pe *A. Craifăleanu* înainte de vreme, cînd era încă în plin elan creator și mai putea aduce un aport substanțial la dezvoltarea biochimiei în țara noastră.

Ca pionieri ai biochimiei vegetale românești pot fi socotiți în primul rînd profesorii *E. Teodorescu* (1866—1949) și *N. T. Deleanu* (1879—1959).

Cel dintîi, binecunoscut specialist în fiziologia plantelor, și-a consacrat o bună parte din activitatea sa cercetărilor asupra pigmenților vegetali, ca și studiului proceselor de asimilație clorofiliană. Cel de-al doilea, format inițial ca farmacist și activînd apoi în învățămîntul superior farmaceutic, a abordat în cercetările sale mai ales probleme de biochimie vegetală, referitoare la nutriția minerală a plantelor, la repartiția și migrația componentelor minerale și organice în țesuturile plantelor, la biochimismul respirației plantelor, la variațiile cantitative ale unor pigmenți vegetali (clorofilă, carotină, xantofilă) în cursul perioadei de vegetație etc. Dintre rezultatele valoroase obținute în aceste cercetări, mai ales cele privitoare la biochimismul respirației plantelor au făcut ca profesorul *N. T. Deleanu* să fie larg cunoscut și deseori citat în literatura de specialitate.

În legătură cu lucrările de mai sus asupra pigmenților vegetali se mai pot aminti și contribuțiile numeroase pe care le-a adus în studiul antocianilor fiziologul *S. Ionescu* (1881—1945), profesor de fiziologie vegetală la universitățile din Iași și București.

Dintre profesorii care, activînd în învățămîntul superior medical sau farmaceutic, fac parte de asemenea dintre înaintașii biochimiei vegetale românești, mai trebuie amintiți *I. Vintilescu* (1881—1954) și *C. N. Ionescu* (1907—1957), care s-au remarcat și au ajuns cunoscuți pe plan mondial îndeosebi prin cercetările lor privitoare la sinteza biochimică a β-glicozizilor, prin descoperirea și studierea mai multor noi glicozizi din diferite plante, ca și printr-o serie de lucrări din domeniul cineticii enzimelor. Tot profesorul *I. Vintilescu* a fost preocupat de cunoașterea compoziției alimentelor din țara noastră și a publicat o serie de tabele în care un loc însemnat revine alimentelor de origine vegetală.

Contribuții însemnate la cunoașterea compoziției chimice a produselor vegetale de la noi a adus apoi, la sfîrșitul secolului trecut și la începutul secolului nostru, profesorul *Al. Zaharia* (1866—1938), întemeietorul catedrei de chimie agricolă de la Facultatea de științe a Universității din București, a cărui principală operă privește compoziția grîului românesc, precum și profesorul *V. Cârnu-Munteanu* (1858—1903), conducătorul Stațiunii agronomice centrale din București, și colaboratorii și succesorii săi la conducerea acestei stațiuni, *C. Roman* (1860—1919), și *I. Enescu* (1861—1938), care au publicat numeroase date asupra compoziției chimice a semințelor principalelor culturi agricole din țara noastră (grîu, porumb, floarea-soarelui etc.).

În mod deosebit trebuie amintită și activitatea bogată pe care a desfășurat-o în domeniul biochimiei aplicate la agricultură profesorul *H. Vasiliu* (1880—1954), întemeietorul catedrei de chimie agricolă de la Universitatea din Iași și autor al unor valoroase lucrări privitoare la nutriția plantelor și a animalelor. De un interes cu totul particular este și faptul că

profesorul *H. Vasiliu* poate fi socotit ca unul dintre precursorii concepțiilor moderne despre structura spiralată a moleculelor substanțelor proteice, dat fiind că încă din anii 1935—1936 a elaborat o schemă de acest fel, a calculat valorile parametrilor acestei structuri și a formulat ipoteza despre existența în aceste molecule a unor forme de legături interne diferite de cele peptidice. Ținînd seama de nivelul general al cunoștințelor din acea perioadă cu privire la structura substanțelor proteice, ca și de posibilitățile de cercetare de pe atunci, ipoteza formulată acum 30 de ani de profesorul *H. Vasiliu*, rămasă din păcate necunoscută pe plan mondial, prezintă un interes istoric cu atît mai mare, cu cît principalele ei trăsături se regăsesc în concepțiile actuale unanim admise, bazate pe modelul publicat cu mult mai tîrziu de *L. Pauling* și *R. Corey*.

De altminteri, în condițiile din trecut, cînd multe dintre publicațiile științifice apărute în țara noastră, chiar dacă erau redactate în limbi străine, nu aveau decît o circulație relativ restrînsă, nu este de mirare că o parte, de loc neglijabilă, din rezultatele cercetărilor întreprinse de biochimiștii români nu a beneficiat de o notorietate mai largă și că zadarnic am căuta lucrările respective și numele autorilor lor în repertoriile literaturii științifice mondiale.

Pe de altă parte, întrucît înaintașii amintiți mai sus au predat biochimia la facultăți ai căror absolvenți nu urmau să devină la rîndul lor biochimiști, ci să activeze ca medici, farmaciști, biologi, agronomi etc., de asemenea nu este de mirare că nici unul dintre ei nu a putut forma o școală de biochimie, că în biochimia românească nu s-au conturat anumite direcții proprii de cercetare, cu tradiție. De aceea, se poate afirma că, deși în țara noastră s-au obținut în trecut rezultate originale valoroase, dintre care însă numai o parte au ajuns să fie bine cunoscute și apreciate și peste hotare, nivelul general al cercetării biochimice de la noi era totuși, în general, destul de modest.

Schimbările profunde petrecute în viața social-politică a țării după 23 August 1944 s-au reflectat, după cum se știe, și în sectorul activității de cercetare științifică, acesta primind din partea statului nostru un sprijin de o amploare niciodată întîlnită mai înainte. Îmbunătățindu-se considerabil condițiile de lucru în toate domenile de cercetare, au beneficiat de acest nou climat și oamenii de știință care-și desfășoară munca pe tărîmul biochimiei. În fața lor a apărut însă astfel o dublă sarcină : pe de o parte, să lichideze rămînerea în urmă, moștenită din trecut, a biochimiei românești, iar pe de alta să contureze profilul și să accelereze ritmul cercetărilor, pentru a putea ține pasul cu dezvoltarea cu adevărat vertiginoasă pe care biochimia a luat-o în ultimul sfert de secol pe plan mondial.

În acest scop era necesar să se creeze, pe de o parte, baza materială corespunzătoare, prin înființarea unor noi centre de cercetare și prin înzes-

trarea laboratoarelor cu utilaj la actualul nivel al tehnicii cercetărilor de biochimie, iar pe de alta să se extindă învățămîntul biochimic, pentru a se crea noi cadre cu pregătire serioasă de biochimie, și să se trimită un număr cît mai mare de tineri cercetători la specializare în centre cu tradiție, sub îndrumarea unor savanți cu renume.

Se pot înregistra realizări însemnate în toate aceste direcții. Dintre ele va fi suficient să se amintească aici, în primul rînd, înființarea Institutului de biochimie al Academiei Republicii Socialiste România în anul 1952 și a unor secții de biochimie în unele institute de cercetări departamentale, ca și înființarea unei secții de biochimie în cadrul Facultății de chimie a Universității din București și a numeroase catedre de biochimie în învățămîntul superior de alte specialități (medicină, agronomie etc.), toate acestea din ce în ce mai bine dotate și din ce în ce mai larg încadrate cu forțe proaspete.

În aceste noi condiții, biochimia s-a putut dezvolta într-adevăr în țara noastră, în timpul din urmă, într-un ritm mai rapid, iar cantitatea și calitatea producției științifice românești în acest sector s-au îmbunătățit de la an la an, astfel că astăzi există domenii în care lucrările românești de biochimie sînt la nivelul mondial. Printre succesele indiscutabile, mai recente, ale biochimiștilor români se pot aminti : caracterizarea anumitor substanțe proteice din țesuturile animale și vegetale ; precizarea structurii și mecanismului de acțiune al unor enzime ; descoperirea mecanismelor de biosinteză ale unor compuși ai țesuturilor ; stabilirea relațiilor dintre hormoni și metabolism ; lămurirea structurii și rolului biochimic al unor virusuri ; evidențierea unor modificări ale metabolismului în diferite boli ; lămurirea unor aspecte ale biochimismului plantelor noastre agricole ; aplicarea unor procese fermentative și de biosinteză industrială în industria alimentară, în industria fermentativă, în industria medicamentelor etc. ; elaborarea unor noi metode de cercetare ; elaborarea unor noi concepții teoretice, care deschid noi căi de abordare a unor probleme atît în domeniul specific al biochimiei, cît și în diferitele ramuri ale biologiei teoretice și aplicate.

Se poate consemna apoi o substanțială îmbunătățire a difuzării rezultatelor obținute de biochimiștii români, ceea ce se datorește faptului că din 1958 a început să apară prima revistă de specialitate din țara noastră, „Studii și cercetări de biochimie", alături de care mai apare, din 1964, revista similară în limbi străine „Revue roumaine de biochimie", ambele larg răspîndite, prin schimb de publicații, în toate cele cinci continente.

De altfel, interesul pe care l-au trezit în străinătate lucrările de biochimie efectuate în țara noastră în ultimii 10—15 ani se manifestă și prin cererile din ce în ce mai numeroase de extrase din publicațiile apărute în diferitele periodice, ca și prin invitațiile ce se adresează biochimiștilor

români, de către unele reputate centre de cercetare din străinătate, de a participa la congrese și simpozioane internaționale, de a ține conferințe etc., respectiv prin efectuarea de stagii de specializare de către cercetători din străinătate la Institutul de biochimie al Academiei Republicii Socialiste România și la alte centre de cercetare biochimică românești.

Se poate afirma deci că impulsul înviorător pe care, după instaurarea puterii democarat-populare, sectorul cercetării biochimice românești l-a primit din partea statului, a început să dea roade din plin, că biochimiștii români au pornit cu pași hotărîți înainte și se găsesc pe drumul cel bun, că perspectivele de dezvoltare și progres ale biochimiei românești sînt larg deschise, că bilanțul pe care biochimia românească îl încheie cu prilejul centenarului Academiei Republicii Socialiste România este pozitiv și că viitorul poate fi privit cu încredere.

DIN PARTEA COMITETULUI DE REDACȚIE

H. SLUȘANSCHI

ST. CERC. BIOCHIM., 9, 4, 347–357 (1966)

CONTRIBUŢII LA STUDIUL BIOCHIMIEI REZISTENŢEI LA GER A CEREALELOR DE TOAMNĂ

NOTA V. STUDIUL COMPARATIV AL ACTIVITĂŢII DEHIDRAZELOR ŞI RESPIRAŢIEI LA CEREALE DE TOAMNĂ ÎN TIMPUL IERNII. UNELE DIFERENŢIERI LEGATE DE POTENŢIALUL REDOX

I. BRAD, V. SOTIRIU ŞI V. STEROIU

577.16 : 633.1

Rezumat — Determinarea activităţii dehidrazelor cu ajutorul TTC la soiuri de grîu a dus la concluzia că rezultatele obţinute sînt în funcţie de condiţiile de experimentare şi de temperatura la care au fost supuse plantele. Determinarea respiraţiei la soiuri de grîu şi la specii a dus la concluzia că este mai indicată executarea acestei determinări menţinînd plantele la temperatura din cîmp. Prin aceasta se realizează o justă apreciere a rezistenţei, a proceselor catabolice din plantă şi, în consecinţă, o mai corectă înţelegere a procesului de supravieţuire. Determinările cu ajutorul reactivilor cu diferite potenţiale redox reprezintă un procedeu important şi de perspectivă pentru aprecierea modificărilor energetice. În text sînt discutate pe larg şi alte aspecte legate de aceste probleme.

În lucrări anterioare [4—6] au fost prezentate date referitoare la relaţia dintre conţinutul de vitamină C, activitatea catalazei, activitatea peroxidazei, conţinutul de zahăr direct reducător şi total [43] şi rezistenţa la ger a cerealelor de toamnă. În lucrarea de faţă sînt prezentate unele rezultate obţinute la determinarea activităţii dehidrazelor, a consumului de oxigen şi a eliminării de bioxid de carbon la plante cu rezistenţă diferită la ger. Deoarece toţi indicii amintiţi mai sus sînt legaţi de procesul de oxido-reducere, de procese de catabolism, am considerat că este indicat ca în aceeaşi lucrare să fie trecute şi unele rezultate obţinute în determinări cu reactivi de potenţial redox diferit. Sînt scoase astfel în evidenţă aspecte legate de bioenergetică, diferenţele constatate fiind legate de conţinutul de energie liberă şi de capacitatea de reacţionare a substanţelor dintr-un ansamblu [37].

Literatura este extrem de săracă în informaţii privitoare la relaţia dintre activitatea dehidrazelor şi rezistenţa la ger, în pofida importanţei activităţii dehidrogenazelor pentru procesele vitale. Între cercetările legate de determinarea activităţii dehidrazelor se enumeră lucrările lui Derenne

[12], [13], care a aplicat testul clorurii de *2, 3, 5*-trifenil-tetrazoliu (TTC), Diaconu [11], Lakon [24], Strauss şi colab. [39]. S-a desprins concluzia că există proporţionalitate între viablitatea ţesutului şi intensitatea colorației roz-roşii datorite formării formazanului.

În legătură cu consumul de oxigen sau eliminarea de bioxid de carbon s-au făcut un număr mai mare de cercetări. Rezultatele nu au dus la o concluzie unică asupra acestor indici. Din lucrările lui Govorov [20], Martin [30], Levitt [25], se deduce că părerile în ce priveşte legătura dintre intensitatea consumului de oxigen şi rezistenţa la ger sînt împărţite, unii autori găsind o relaţie directă, alţii o relaţie inversă, iar alţii negăsind nici o relaţie între aceşti doi factori. În cazul unui consum mare de oxigen s-ar ajunge la micşorarea rezervelor de glucide şi astfel la pierea plantelor (Levitt[25], Dexter [14], [15]). În legătură cu eliminarea de bioxid de carbon, concluziile sînt tot aşa de contradictorii, după cum rezultă din lucrările lui Levitt [25], Goodman şi Weding [9], Kuşnirenko [10], Moiseev [31], Skofenko [35], Chirilei şi colab. [8], [9], Valuţă, Brad, Laszlo şi Sotiriu [40], [41], Buican [7]. Există totuşi tendinţa de predominare a părerii despre existenţa unei relaţii inverse între respiraţie şi rezistenţă. Alţi autori s-au ocupat de aspecte particulare, ca : legătura dintre respiraţie şi aprovizionarea cu apă [36], influenţa epocii de însămînţare asupra respiraţiei [28], raportul CO_2/O_2 [32], [2], [18], respiraţia la temperaturi sub 0°C [22], influenţa timpului trecut de la începerea determinărilor asupra respiraţiei [29]. Tot în legătură cu respiraţia, Bogdan [2], [3] afirmă că frigul induce o stare patologică în respiraţie, iar Belkin [1] crede că intensitatea respiraţiei este determinată de activitatea enzimelor participante la respiraţie.

Deşi cercetările referitoare la respiraţie sînt relativ numeroase ele nu explică încă toate aspectele. În acelaşi timp, ele nu au fost asociate cu cercetări care să analizeze mai intim aspectele de bioenergetică. Astfel, fosforilarea oxidativă sau fotofosforilarea, aspecte extrem de interesante şi pentru care este de aşteptat să se găsească valori mai mari la plantele mai rezistente la ger, nu au fost analizate de nimeni. Aspectul bioenergetic global este luat în discuţie de Jolkevici [23], care afirmă că deficitul energetic trebuie să fie proporţional cu gradul de rezistenţă. Aspectul bioenergetic legat de potenţialul redox este foarte puţin luat în consideraţie la plante. Subotina [37] analizează acest aspect legat de veştejire şi constată o creştere a potenţialului de oxido-reducere. Grupările —SH, care constituie grupările active ale multor enzime [16], [17], [38], sînt analizate printr-o metodă redox argentometrică de Levitt şi colab. [26], [27], Schmutz şi colab. [33], Waisel şi colab. [42]. Aceste determinări prezintă însă numai un aspect particular şi special al unui capitol foarte puţin abordat.

Determinările noastre referitoare la activitatea dehidrazelor au fost făcute pentru a se stabili dacă pe această cale este posibilă o selecţionare a plantelor în funcţie de rezistenţă şi, în raport cu rezultatele obţinute, să se acumuleze datele necesare interpretării mecanismului de rezistenţă, cu implicarea dehidrazelor şi în corelaţie cu alte rezultate. Aceste determinări se impuneau şi ca o consecinţă a lipsei unor determinări referitoare la acest aspect. Determinarea respiraţiei (oxigenul consumat şi bioxidul de carbon eliminat) s-a executat în acelaşi scop, al selecţionării plantelor

și al completării tabloului metabolic. Noi nu ne puteam folosi pentru interpretarea rezultatelor noastre de concluziile contradictorii ale atîtor autori.

Într-o lucrare anterioară [41], analizînd eliminarea de bioxid de carbon la nouă soiuri de grîu la temperatura din cîmp, am constatat o ordonare destul de riguroasă a acestor soiuri. Cantitatea cea mai mare de bioxid de carbon eliminat s-a constatat la soiul mai puțin rezistent. Am considerat necesar să determinăm eliminarea de bioxid de carbon la soiuri de grîu la 20°C, după recoltarea din cîmp și după supunerea la temperaturi scăzute. Determinările cu ajutorul reactivilor cu potențial redox diferit au fost executate din convingerea că prin acest procedeu se pot face constatări în legătură cu schimburile energetice, cu implicațiile metabolice largi, complexe. Determinările lui Levitt ne-au sugerat ideea acestui procedeu general, față de care argentometria nu reprezintă decît un caz particular. Considerăm procedeul de o deosebită importanță și de mare perspectivă, fiind net superior procedeului calorimetric, din motive care vor fi discutate într-o altă lucrare.

Contribuția generală a acestei lucrări la elucidarea problemelor de biochimie legate de rezistența la ger constă deci în aceea că unele aspecte analizate au fost puțin abordate în legătură cu acest subiect sau nu au fost analizate astfel încît să pună în evidență anumite particularități care merită atenție. În ansamblul lui, un asemenea studiu nu a fost încă realizat.

MATERIAL ȘI METODE

Determinarea activității dehidrazelor, prin care se apreciază și viabilitatea țesuturilor s-a executat pe nodul cu hipocoti, la 36 de soiuri de grîu cu rezistențe diferite, folosindu-se soluție de clorură de trifenil-tetrazoliu (TTC) 0,1$^0/_{00}$, în amestec tampon, fosfat, pH 7,2. După recoltarea din cîmp, plantele au fost ținute între — 5 și — 8°C. Apoi, nodul cu hipocotil a fost desprins și introdus în soluția de TTC. Prin vacuum infiltrație, soluția a fost introdusă în țesut, iar după 30 min de la restabilirea presiunii atmosferice normale a fost apreciată vizual intensitatea colorației roz-roșii a țesutului. În experiența următoare s-a lucrat numai cu trei soiuri de grîu : Lutescens 1060/10, soi foarte rezistent, B—457, soi cu rezistență medie, și San Pastore, soi nerezistent. S-a urmărit determinarea diferenței dintre activitatea dehidrazelor la plante luate din cîmp față de plantele supuse la temperaturi puternic scăzute (— 19°C. Activitatea a fost determinată atît de nodul cu hipocotil întreg, cît și pe țesutul mojarat, întrebuințîndu-se o tehnică întrucîtva deosebită. O parte din plantele recoltate din cîmp la 3—5°C au fost supuse la — 19°C și acest lot a fost apoi împărțit în două. Pentru metoda prin *vacuum* infiltrație s-a folosit un amestec de 75 ml de soluție tampon fosfat pH 7,2, 45 ml de soluție tamponată 1$^0/_{00}$ TTC și 30 ml de soluție tamponată de acid succinic 1$^0/_{00}$. În această soluție s-au introdus 2 g de nod cu hipocotil pentru fiecare soi, atît pentru plantele luate din cîmp, cît și pentru cele ținute la frigider. După *vacuum* infiltrație, prin cîteva vidări și restabiliri ale presiunii normale, probele au fost lăsate la temperatura camerei timp de o oră. Întreaga cantitate de nod cu hipocotil corespunzătoare unei variante a fost mojarată cu nisip și acetonă, aducîndu-se la un volum constant (25 ml). S-au apreciat vizual diferențele de colorație, notîndu-se cu 10 intensitatea maximă. Pentru determinările pe țesut mojarat s-au folosit 2,5 g de nod cu hipocotil, aduși la 50 ml cu amestecul utilizat mai sus la vacuum infiltrație. S-au lăsat apoi probele 18 ore la 36°C, după care s-a făcut o dublă extracție cu acetonă și cloroform (25 ml). S-a apreciat vizual colorația.

Pentru efectuarea studiului comparativ referitor la consumul de oxigen şi la eliminarea de bioxid de carbon, au fost folosite soiul de secară Petkus, foarte rezistent la ger, soiul de grîu A—15, cu rezistenţă medie, şi soiul de orz Cenad 396, mai puţin rezistent la ger decît celelalte. Determinările de bioxid de carbon eliminat la specii s-au făcut la temperatura din cîmp, iar cele de oxigen consumat la 20°C. Tot pentru determinarea bioxidului de carbon eliminat s-au folosit pentru studiul comparativ mai multe soiuri de grîu cu rezistenţă diferită, care, după ce au fost recoltate din cîmp la — 3°C, au fost supuse şi la — 10°C în frigider. S-au făcut determinări şi după recoltarea din cîmp, şi după ţinerea la frigider. Pentru determinarea consumului de oxigen s-a folosit metoda Warburg, iar pentru bioxidul de carbon eliminat s-a folosit metoda Boysen-Jensen, făcîndu-se media a 3—5 determinări [17], [34].

Pentru determinările cu reactivi de potenţial redox variabili s-au făcut extracţii din frunze de grîu Lutescens 1060/10, B—457 şi San Pastore. Extracţia apoasă s-a făcut pentru fiecare din 5 g de frunză proaspătă mărunţită la cald şi extractul s-a adus la 100 ml cu apă distilată. După filtrare s-au făcut titrări pentru fiecare soi, folosindu-se 5 ml de extract. Titrările s-au făcut cu MnO_4K n/20, I_2 în soluţie alcalină, Cu^2 (Fehling-Soxhlet) şi fericianură de potasiu (Hagedorn-Jensen). Rezultatele au fost exprimate în mililitri de soluţie N/20.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Determinarea activităţii dehidrazelor după supunere la — 9°C s-a făcut ţinîndu-se seama de unele rezultate obţinute anterior [11], care arătau că la —9°C se realizează o bună diferenţiere între soiuri după procentul de plante moarte. S-a crezut că şi la determinarea dehidrazelor se va realiza o ordonare conformă cu rezistenţa la ger. Rezultatele au fost însă necorespunzătoare aşteptărilor, soiuri foarte rezistente plasîndu-se în vecinătatea unor soiuri cu rezistenţă intermediară sau foarte mică. Aceste rezultate au dus totuşi la concluzia că la această temperatură soiurile nerezistente au în general o slabă activitate dehidrazică, datorită distrugerii acestui echipament enzimatic, iar cele mai rezistente au o activitate dehidrazică apropiată, datorită unei bune adaptări la scăderea temperaturii, prin micşorarea activităţii dehidrazelor, fără distrugerea lor. Apare deci că determinările executate numai la această singură temperatură nu sînt suficiente. Se deduce de aici că este necesară compararea rezultatelor obţinute după menţinerea plantelor la temperaturi scăzute pozitive cu rezultatele obţinute după menţinerea plantelor la temperaturi negative foarte scăzute, apropiate de limita de rezistenţă a celui mai bun soi. S-a ţinut seama şi de presupunerea exprimată în lucrările anterioare [4], [5], [6], după care, în plantele mai rezistente, enzimele au o capacitate enzimatică mare, care nu se poate manifesta *in vivo* din cauza unor condiţii ce impun o stare de latenţă profundă. Aceste condiţii însă favorizează o mai bună protecţie, activarea realizîndu-se la scăderea temperaturii pentru unele enzime [5], [6]. Prin distrugerea ţesuturilor la determinările *in vitro* sînt înlăturate acele condiţii care nu permiteau manifestarea capacităţii reale a enzimelor. De aceea s-a considerat că prin executarea în paralel a unor determinări *in vivo* şi *in vitro* s-ar acumula date noi în legătură şi cu acest aspect şi s-ar putea da o pronunţare pentru unele procedee. Rezultatele obţinute în experienţele conforme cu acest punct de vedere sînt trecute în tabela 2. S-au folosit trei soiuri de grîu : cu rezistenţă foarte mică, intermediară şi foarte mare. Din analiza tabelei 1 se observă că la plantele recoltate la

3—5°C activitatea cea mai mare se constată la soiul San Pastore prin procedeul vacuum infiltrației și la soiul Lutescens 1060/10 prin procedeul cu mojarare. Soiul cu rezistență intermediară își păstrează de fiecare dată locul. S-ar părea deci că experiențele confirmă presupunerile anterioare.

Tabela 1

Activitatea comparativă a dehidrazelor, determinată prin metoda cu TTC la soiuri de grîu cu rezistență diferită, pentru condiții diferite de temperatură și de lucru

Soiul	Plante luate din cîmp 3—5°C		Plante ținute la frigider — 19°C	
	vacuum infiltrație	mojarare	*vacuum* infiltrație	mojarare
San Pastore	10	6	2	2
B—457	8	8	3	4
Lutescens 1060/10	6	10	5	8

După menținerea la frigider la —19°C, se obține aceeași ordonare a soiurilor pentru ambele metode, paralel cu o scădere generală a activității dehidrazelor, primul plasat fiind grîul Lutescens, și ultimul plasat fiind grîul San Pastore. Aceste rezultate au permis și concluzia că dehidrazele nu sînt activate prin scăderea temperaturii. Se deduce de asemenea că adaptarea plantelor mai rezistente este mai rapidă, enzimele din echipamentul respirator micșorîndu-și activitatea chiar în condițiile unor temperaturi scăzute pozitive. Aceleași rezultate permit să se constate că între plantele supuse la temperaturi foarte scăzute diferențele sînt mai mari decît

Tabela 2

Consumul de oxigen al plantelor de orz, grîu și secară la 20°C, exprimat în mol/g/oră

Planta / Data	Orz Cenad 396		Grîu A—15		Secară Petkus	
	mol	%	mol	%	mol	%
9.XII.1957	81,60	100,00	70,66	100,00	95,40	100,00
11. I.1958	80,46	98,60	62,75	88,69	66,50	69,71
16. II.1958	88,49	108,44	71,51	101,06	56,14	58,85
2. III.1958	52,67	64,55	70,79	100,04	67,39	70,63
5. III.1958	66,64	81,67	77,92	110,12	72,75	76,26
8. IV.1958	48,18	59,04	64,96	91,80	52,77	55,32
14. IV.1958	37,90	46,44	72,27	102,13	47,91	50,21

între plantele ținute la 5°C, mai ales la procedeul prin mojarare. Acest procedeu apare mai indicat pentru trierea plantelor, dar necorespunzător pentru aprecierea stărilor metabolice din plantă. Prin mojarare sînt oxidate grupările —SH și alte substanțe reducătoare ușor oxidabile, care ar putea să reducă TTC în *vacuum* infiltrație și să dea impresia unei activități mai mari decît cea reală. Prin mojarare și determinarea în condițiile descrise, concentrația enzimei scade, dar consecințele se compensează prin mărirea timpului de acțiune. Cum însă fiecare metodă implică un viciu și nu reușește să elucideze toate aspectele, rezultă o consecință oarecum curioasă : cercetările trebuie executate prin amîndouă metodele, după supu-

nerea plantelor la scăderi succesive de temperatură, începînd de la o temperatură scăzută pozitivă, la care nici o plantă n-a expirat, pînă la temperatura la care cea mai rezistentă plantă se găseşte la limită. Pentru aprecierea rezistenţei unor soiuri, rezultă că este bine să se folosească soiuri „reper" cu rezistenţă cunoscută. Rezistenţa soiului luat în consideraţie se apreciază după locul pe care-l ocupă la determinările cu TTC în urma supunerii la temperaturi scăzute succesiv. Indiferent de poziţia iniţială, dacă îşi păstrează ulterior locul între cel mai rezistent şi cel de rezistenţă medie, atunci se poate deduce că are o rezistenţă intermediară. Dacă intensitatea colorației scade, ajungînd între soiul cu rezistenţă medie şi cel cu rezistenţă mică, concluzia este simplă : rezistenţa soiului este intermediară între rezistenţa celor două soiuri şi aşa mai departe.

Alături de activitatea dehidrazelor, consumul de oxigen al plantelor şi eliminarea de bioxid de carbon, care constituie expresia activităţii vitale a plantelor, sînt determinări de mare importanţă pentru caracterizarea stării unui organism. Determinările de consum de oxigen, executate de noi pentru secară, grîu şi orz (tabela 2), scot în evidenţă faptul că iniţial nu există o corelaţie între rezistenţă şi consumul de oxigen, nici directă şi nici inversă. Numai după o mai lungă înaintare în iarnă (16.II.1958), planta cea mai rezistentă, secara are consumul cel mai mic de oxigen şi în acelaşi timp scăderea procentuală cea mai mare în raport cu consumul iniţial. Ceea ce atrage atenţia la orz este faptul că, în raport cu consumul iniţial, consumul de oxigen la 16. II. 1958 este mai mare. Aceasta ar corespunde afirmaţiei că scăderea temperaturii induce creşterea respiraţiei. La temperatura din cîmp, lucrurile nu stau efectiv aşa. Din cauza însă a neadaptării, procesele care necesită consum de oxigen au fost mai intense în raport cu aportul de oxigen, realizîndu-se astfel o datorie fiziologică faţă de oxigen. În momentul determinării la 20°C, planta încearcă să scape de această datorie, produşii acumulaţi stimulînd această respiraţie. Din cauza neadaptării, după scurt timp celulele încep să moară, apărînd o bruscă scădere a respiraţiei la orz faţă de un consum staţionar la grîu sau în creştere la secară (16.II.1958 faţă de 2.III.1958 — tabela 3). De aici se poate conchide că determinările la 20°C nu pun în evidenţă decît gradul de adaptare a plantelor, ţinîndu-se seama de valoarea iniţială a consumului.

Este tot aşa de posibil ca o respiraţie scăzută să corespundă unui început de distrugere a unora dintre celule şi să se realizeze astfel o egalitate cu o plantă care are respiraţia scăzută prin adaptare. Precizarea s-ar părea că se poate realiza prin determinările cu TTC, prin care s-ar putea face distincţia dorită.

Aceste concluzii au arătat necesitatea determinării respiraţiei în cîmp în condiţiile de temperatură existente la data recoltării. Aceasta a fost urmărită prin determinarea bioxidului de carbon, singura posibilă în astfel de condiţii. Este important de observat că nici în aceste condiţii nu se constată o ordonare strictă a eliminării de bioxid de carbon după rezistenţă (tabela 3). Iniţial, eliminarea de bioxid de carbon a fost cea mai mare la secară, planta cea mai rezistentă. Scăderile procentuale sînt însă continue şi mult mai mari la secară, eliminarea de CO_2 ajungînd la 31.I.1959 — atît în valoare relativă, cît şi în valoare absolută — mai mică decît la grîu şi orz, la care s-a observat de asemenea o scădere continuă, dar mai puţin

puternică. Această ordonare destul de strictă după valorile procentuale nu se mai constată dacă determinările se fac așa cum s-au făcut la consumul de oxigen, adică la 20°C, după ce plantele au stat la o anumită temperatură scăzută (tabela 4). Este adevărat că la toate soiurile de grîu analizate s-a ob-

Tabela 3

Bioxidul de carbon eliminat de plantele de orz, grîu și secară la t°C, exprimat în μ mol/g/oră

Planta / Data	Orz Cenad 396		Grîu A—15		Secară Petkus		t°C de lucru
	mol	%	mol	%	mol	%	
6.XII.1958	45,30	100	61,50	100	62,19	100	1,3°C
8. I.1959	26,40	79	31,90	52	30,29	48	2°C
31. I.1959	21,85	56	18,90	31	15,24	24	0,4°C
11. III. 1959	41,90	113	41,78	68	24,60	39	6°C

servat o scădere a cantității de bioxid de carbon eliminate, dar ordonarea nu a fost riguroasă în raport cu rezistența la ger, nici după recoltarea din cîmp și nici după supunerea la — 10°C. Reamintim că soiurile Hostianum 237 și Minhardi sînt foarte rezistente la ger, soiurile 131— C și Nr. 301 au

Tabela 4

Bioxidul de carbon eliminat de plantele diferitelor soiuri de grîu după recoltare din cîmp la — 3 °C și după supunerea la —10 °C, exprimat în μ mol/g s.u/.oră (21.I.1962)

Soiul	— 3°C	— 10°C	Raport	Soiul	— 3°C	— 10°C	Raport
Hostianum 237	525	127	3,36	Cenad 117	570	157	3,31
Lutescens 1060/10	562	195	2,88	Miciurinka	480	142	3,36
Minhardi	570	142	4,01	Ponca	540	172	3,13
131—C	472	195	2,42	Wichita	510	172	2,95
Bezostaia 1	607	180	3,24	Nr. 301	414	210	1,93
Skorospelka 3	570	180	3,04	405—B	622	180	3,32
Mironovskaia 264	502	195	2,57	Studina 159	457	172	2,65
Triumph	487	180	2,60	Odvos 247	592	172	3,43
457—B	435	172	2,52	Osetinskaia	547	127	4,29
A—15	442	225	1,96	Kooperatorka	532	165	3,22
495—C	575	195	2,92	Harrach	525	180	2,80
458—B	442	195	2,26	Etoile de Choisy	465	187	2,48
Iași 645	577	157	3,66	San Pastore	585	157	3,71

rezistență mare sau medie, soiurile 405—B Harrach au o rezistență mică la ger, iar soiurile Etoile de Choisy și San Pastore sînt foarte puțin rezistente la ger. Constatăm totuși că raportul dintre cele două valori a fost cel mai mare la Osetinskaia (4,29), Hostianum 237 (4,11) și Minhardi (4,08). Valori mari ale acestui raport se constată însă și la San Pastore (3,71), Odvos 247 (3,43) și alte soiuri puțin rezistente. Aceste rezultate ne duc la concluzia formulată și în cazul consumului de oxigen. Poate rezulta de aici că o aceeași creștere a raportului se datorează micșorării eliminării de bioxid de carbon, într-un caz prin adaptare, iar în celălalt caz prin moartea unor celule. Asocierea determinării cu ajutorul TTC rezultă și de aici ca obligatorie. Ar părea chiar mai indicată determinarea decarboxilazelor după același criteriu, ca și în cazul dehidrazelor. S-ar putea astfel constata dacă acestea au fost distruse sau au fost numai trecute în condiții de la-

tenţă. Oricum, determinarea respiraţiei la temperaturi scăzute în cîmp, printr-un procedeu adecvat, apare superioară atît din punctul de vedere al folosirii ei ca indice de apreciere a rezistenţei cît şi din punctul de vedere al posibilităţilor de interpretare. Astfel putem să aflăm cuantumul real al procesului respirator, valorile reale ale schimbului energetic.

Se pune însă întrebarea dacă şi printr-un alt procedeu este posibilă aprecierea pierderilor energetice, simultan cu detectarea calităţii substan-

Tabela 5

Volumul de reactiv cu potenţial redox diferit,* necesar pentru titrarea unui volum egal de extract apos din soiuri de grîu cu rezistenţă diferită (ml 0,05 n pentru 5 ml de extract apos 1/20)

Reactiv / Soiul	$KMnO_4$ sol. acidă		I_2 sol. alc.		$Fe(CN)_6K_3$		Cu^2+ (Fehling Soxhlet)	
	ml	%	ml	%	ml	%	ml	%
San Pastore	5,20	100	1,74	100	1,65	100	1,12	100
B—457	5,90	113	2,00	115	1,93	117	1,56	139
Lutescens 1060/10	7,00	134	2,78	160	3,00	181	2,19	195
Ev	1,52		1,07		0,36			0,17

* Creşterile pe verticală sînt calculate în raport cu valorile pentru San Pastore considerate drept 100.

ţelor catabolizate. Desigur că metoda dozării cu substanţe cu potenţial redox diferit apare ca răspunsul cel mai indicat. Rezultatele din tabela 5 arată că, pe măsură ce potenţialul redox se micşorează, un acelaşi volum de extract se titrează cu un număr mai mic de mililitri de soluţie de aceeaşi normalitate, la toate soiurile, fapt de aşteptat. De asemenea, la soiul cel mai rezistent, titrarea se face cu un volum mai mare. Să considerăm şi aceste date tot ca ceva uşor de dedus, pornind de la cunoscutul fapt că plantele mai rezistente au un extract refractometric (hidrosolubil) mai ridicat. Însă la titrarea cu permanganat de potasiu, planta mai rezistentă depăşeşte numai cu 34% planta mai puţin rezistentă. Prin titrarea cu cupru bivalent, planta mai rezistentă depăşeşte cu 95% planta mai puţin rezistentă. Deci, în plantele mai rezistente se găsesc în proporţie mai mare substanţe cu potenţial redox mai scăzut. Aceasta înseamnă că şi oxidările sînt mai slabe, dar poate să însemne şi că în plantele mai rezistente este posibilă oxidarea substanţelor cu un potenţial redox iniţial mai ridicat. Revenind la dehidraze, dacă acestea îşi păstrează activitatea la plantele mai rezistente, se poate imagina că hidrogenul nu ajunge integral sub formă de apă şi este trecut pe o substanţă care conţine un oxigen. Prin aceasta se face o economie de energie, nu este nevoie de oxigen din afară şi se măreşte capacitatea reducătoare faţă de alte plante, nerezistente.

În raport cu aceste considerente, faptul că determinările argentometrice ale grupărilor —SH [26], [27], [42], arată prezenţa acestora în cantitate mai mare la plantele mai rezistente apare ca un caz particular al unui fenomen mai general. Are însă şi aspecte speciale, referindu-se la grupări active ale enzimelor. Nu se poate însă absolutiza această determinare ca indice de triere, deoarece grupările —SH pot face parte din constituţia unor enzime cu rol chiar opus în mecaismul rezistenţei la ger. De aceea este necesară şi referirea la conţinutul de substanţe redox ener-

getice, nu numai catalitice, ca în cazul de mai sus. Pentru a evidenția aceasta, să luăm în considerație datele anterioare [4,43] în care sînt exprimate, în glucoză, substanțele dozate cu fericianură de potasiu și, în acid ascorbic, substanțele dozate cu 2, 6- diclorfenol indofenol, la aceleași soiuri, la frunze și la noduri (februarie 1962). Precizăm că echivalenții celor două substanțe sînt foarte apropiați —90 față de 88. Se observă la titrarea substanțelor catalitice (acid ascorbic) o diferență mică la frunze și nici o diferență la noduri. La dozarea cu fericianură de potasiu se observă o diferență enormă, mai ales la noduri. Dacă se compară conținutul diferitelor substanțe nu între soiuri, ci între organele aceluiași soi, se constată că conținutul de substanțe catalitice (acid ascorbic), de ordinul miligramelor, este mai mare în frunze, dar conținutul de substanțe energetice, de ordinul gramelor, este mai mare în nod. S-ar părea deci că un conținut mare de substanțe sau grupări redox catalitice semnifică rezistență mai mare numai dacă este asociat cu un conținut mare de substanțe redox energetice. De asemenea apare ca un procedeu deosebit de interesant dozarea simultană în cursul unei perioade de vegetație, utilizînd o serie de reactivi redox, al căror spectru de substanțe cu care reacționează este cunoscut.

CONCLUZII

1. Activitatea dehidrazelor determinată prin metoda cu TTC conduce la rezultate diferite, în funcție de condițiile utilizate și de temperatura de expunere a plantelor.

2. Pentru aprecierea rezistenței unui soi sînt indicate folosirea unor soiuri „reper", expunerea plantelor la temperaturi scăzute succesiv și determinarea dehidrazelor prin *vacuum* infiltrație și mojarare cu ajutorul TTC.

3. Consumul de oxigen și eliminarea de bioxid de carbon scad mai mult, în valoare relativă, la plantele mai rezistente în raport cu valorile inițiale, o dată cu înaintarea în iarnă și scăderea temperaturii. Se impune calcularea și a valorilor relative față de intrarea în iarnă, pentru o corectă apreciere a rezistenței.

4. Prin determinarea bioxidului de carbon eliminat la temperaturi scăzute, la plantele mai rezistente se constată valori absolute mai scăzute, ca și scăderi relative mai puternice, o dată cu avansarea în iarnă. Determinarea eliminării de bioxid de carbon la temperatura din cîmp apare ca un procedeu mai corect și mai eficace.

5. În vederea dozării unei cantități egale dintr-un extract realizat în aceleași condiții, se utilizează un volum mai mare de reactivi redox pentru extractele din plantele mai rezistente.

6. Prin micșorarea potențialului de oxido-reducere al reactivului utilizant se micșorează volumul soluției de aceeași normalitate utilizată, dar se mărește diferența relativă dintre soiul rezistent și cel nerezistent.

7. La plantele rezistente se găsesc într-o proporție mai mare substanțe dozabile cu soluție de potențial redox mai scăzut.

8. Rezultatele obținute la dozarea cu reactivi redox a substanțelor catalitice trebuie corelate cu rezultatele obținute la dozări cu reactiv redox ale substanțelor energetice.

9. Este necesară extinderea procedeului de titrare simultană cu un număr mare de reactivi redox cu potențial cunoscut. Aceasta credem că ar permite aprecierea prin integrare a schimburilor energetice și particularitatea substanțelor transformate.

Prezentat la redacție
la 20 decembrie 1965

Secția de fiziologie și biochimie vegetală, Institutul de cercetări pentru cereale și plante tehnice Fundulea — București

BIBLIOGRAFIE

1. Belkin I.I., *Biohimiceskie pokazateli zimostoikosti i sposobî s gibeliu zimuiuşcih rastenii*, Zimost. selsk. hoz. kult., Moscova, 1960, p. 15.
2. Bogdan I.K., *Jizn ozimoi pşeniţt v period perezimovki*, Zimost. selsk. hoz. kult., Moscova, 1960, p. 49.
3. Bogdan I.K., *Obmen veşcestv i ozimoi pşeniţt v ocenne zimneveseniu period. Fiziologiia ustoicivosti rastenii*, Moscova Izd. Akad. Nauk SSSR, 1960, p. 122.
4. Brad I., *Contribuţii la studiul biochimiei rezistenţei la ger a cerealelor de toamnă. Nota I. Studiul comparativ al conţinutului în vitamină C la cerealele de toamnă în timpul iernii*, St. cerc. biochim., **8**, 163 (1965).
5. Brad I., *Contribuţii la studiul biochimiei rezistenţei la ger a cerealelor de toamnă. Nota II. Studiul comparativ al activităţii catalazei la cerealele de toamnă în timpul iernii*, St. cerc. biochim., **8**, 293 (1965).
6. Brad I., *Contribuţii la studiul biochimiei rezistenţei la ger a cerealelor de toamnă. Nota III. Studiul comparativ al activităţii peroxidazei la cereale de toamnă în timpul iernii*, St. cerc. biochim. **9** 18 (1966).
7. Buican D., *Contribuţii la studiul rezistenţei porumbului la frig*, teză de disertaţie, Bucureşti, 1961.
8. Chiriei H., Dorobanţu N., Sile Elena, *Stabilirea gradului de rezistenţă la ger la cîteva linii noi de grîu de toamnă prin metode citofiziologice*, St. cerc. biol., Seria biologie vegetală, **XII**, 99 (1960).
9. Chirilei H., Mavromati E., *Contribuţii la studiul rezistenţei la ger a cerealelor de toamnă*, Lucrările Sesiunii ştiinţifice din 1—6 februarie 1955, Inst. agr. „N. Bălcescu", vol. I, p. 133.
10. Kuşnirenko S.V., *Fiziologhiceskie osobennosti tomatov i kukuruzi zakalennîh k holodu peremennîmi temperaturami*, Fiz., rast., **5**, 235 (1958).
11. Diaconu P., *O metodă expeditivă pentru determinarea viabilităţii polenului de porumb*. St. cerc. biol., Seria biologie vegetală, **XIII**, 529 (1961).
12. Derenne P., *Application du test du chlorure de 2, 3, 5-triphénylitétrazolium aux plantules de céréales endommagées par le froid*, Bull. Inst. Agron. et Stat. de Rech. de Gembloux, **XXII**, 155 (1954).
13. Derenne P., *Signification du test au chlorure de 2, 3, 5-triphénylitétrazolium appliqué aux céréales en période du gel intense*, Bull. Inst. Agron. et Stat. de Rech. Gembloux, **XXV**, 95 (1957).
14. Dexter S., *Decreasing hardiness of winter wheat in relation to photosynthesis defoliation and winter injury*, Plant. physiol., **8**, 297 (1933).
15. Dexter S., *Effect of several environmental factors on the hardening of plants*, Plant. physiol., **8**, 123 (1933).
16. Dixon M., Webb E., *Enzymes*, Londra-New York-Toronto, Longmans Green and Co., 1958.
17. Ermakov A.I., *Metodî biochimiceskogo issledovaniia rastenii*, Leningrad, Selhozgiz, 1952.
18. Fedorova N.A., *Priemî povişenia zimostoikosti i urojainosti ozimoi pşeniţt v polese i lesostepi Ukraini*, Zimost. selsk. hoz. kultur, Moscova, 1960, p. 114.
19. Goodman V.H., Weding K.T., *The influence of temperature on the respiration of cotton leaf*, Plant. physiol., **31**, 275 (1958).

20. Govorov L., *Priroda razlicinth ozimîh i iarovîh form hlebnîh zlakov v sviazi s voprosami zimostoikosti ozimoi*, Tr. prikl. bot. sel., **13**, 525 (1922—1923).
21. Hais I.M., Macek K., *Cromatografia pe hîrtie*, Bucureşti, Edit. tehnică, 1960.
22. Horinko P.A., *Pricini gibeli i agrokomplecs visokih urojaev ozimoi pşeniţi v permsoi oblasti*, Zimost. selsk. hoz. kult., Moscova, 1960, p. 153.
23. Jolkevici V.N., *O nekotorîh problemî bioenergetiki*, Izd. Akad. Nauk SSSR, Seria biol., **4**, 562 (1963).
24. Lakon G., *Topographischer Nachweis der Keimfähigkeit der Getreidfrüchte durch Tetrazoliumsalze*, Ber. dtsch. bot. Ges., **69**, 299 (1942).
25. Levitt J., *The hardiness of plants*, New York, Academic Press, 1956.
26. Levitt J., Charles Y., Sullivan C.Y., Johnsson N., *Sulfhydrylsa new factor in forst resistance. III. Relation of SH decrease during hardining to protein, glutathion and glutathion oxidezing activity*, Plant. physiol., **37**, 266 (1962).
27. Levitt J., Sullivan C.Y., Johnsson N.O., Pettit R.M., *Sulfhydryls, a new factor in frost resistance. I. Changes in SH content during frost hardening*, Plant. physiol., **36** 611 (1961).
28. Malienko M.P., *Zavisimost mejdu razvitem rastenii pered uhodom v zimu i zimostoikostiu i ozimîh pşeniţ. Fiziol. ustoicivosti rastenii*, Moscova, Izd. Akad. Nauk SSSR, 1960, p. 96.
29. Marincink A.F., Kurbatova A.T., *Dîhanie i okislitelnie fermenti i zimostoikogo i maloustoicivogo sortov klevera. Fiziologiia ustoicivosti rastenii*, Moscova, Izd. Akad. Nauk SSSR, 1960, p. 136.
30. Martin H.J., *Comparative studies of winter hardiness in wheat*, J. Agr. Res., **35**, 493 (1927).
31. Moiseev N.N., *Dîhanie i morozostoikost kostocikovîh plodovîh porod. Fiziologiia ustoicivosti rastenii*, Moscova, Izd. Akad. Nauk SSSR, 1960, p. 285.
32. Okunţov M.M., Aksenova O.F., *Osobennosti povedenia dîhatelnoi sistemî pri zakalivami rastenii*. Fiziologiia ustocivosti rastenii, Moscova, Izd. Akad. Nauk, SSSR, 1960, p. 113.
33. Schmutz W., Sullivan C.Y., Levitt J., *Sulfhydryls, a new factor in frost resistance. II. Relation between sulfhydryls and relative resistance of 15 wheat varieties*, Plant. physiol., **36**, 617 (1961).
34. Skaskin F.D., Lovcinovskaia E.I., Miller M.S., Anikiev V.V., *Praktikum po fiziologii rastenii*, Moscova, Izd. Sov. Nauka, 1958.
35. Skofenko A.O., *Intensivnost dîhania listev raznîh po morozostoikosti sortov plodov kultur*, Visnik Kiivsk un-tu, Ser. biol. vin., **1**, 63—68 (1958).
36. Soloveva M.A., *Vlianie vodnovo rejima i pitania na zimostoikost plodovîh derevev v iujnîh raionah USSR. Razvitie sadovodstvo i vinogradarstvo Krîma*, Simferopol, Krîmizdat, 1959, p. 157.
37. Subotina N.V., *Vlianie zaviadania na okislitelno-vosstanovitelnîi rejim rastenii*, Fiz. rast., **6**, 42 (1961).
38. Soru E., *Biochimie medicală*, vol. I şi II, Bucureşti, Edit. medicală, 1959 şi 1963.
39. Strauss F.H., Cheronis N.D., Strauss E., *Demonstration of reducing enzyme systems in neoplasms and livind mammalian tissues by triphenyltetrazolium chloride*, Science, **108**, 2 796 (1941).
40. Valuţă Gh., Brad I., Laszlo Iulia, *Schimbări fiziologice şi biochimice la orzul de toamnă în condiţiile de iernare ale anului 1956—1957*, St. cerc. biochim, **2**, 147 (1959).
41. Valuţă Gh., Brad I., Laszlo Iulia, Sotiriu V., *Contribuţii la stabilirea unor indici biochimici şi fiziologici de rezistenţă la ger a cerealelor de toamnă*, St. cerc. biol., Seria biol. veget., **XIII** 233 (1961).
42. Waisel Y., Kohn H., Levitt J., *Sulfhydryls- a new factor in frost resistance. IV. Relation of GSH- oxidising activity to flower induction and hardiness*, Plant. physiol., **37**, 272 (1962).
43. Brad I., *Contribuţii la studiul biochimiei rezistenţei la ger a cerealelor de toamnă. Nota IV. Studiul comparativ al conţinutului în zahăr direct reducător şi total la cerealele de toamnă, în timpul iernii*. St. cerc. biochim., **9** *3*, 249 (1966))

ST. CERC. BIOCHIM., 9, 4, 359–366 (1966)

FLUORO-IMUNOELECTROFOREZA

VICTOR GHEȚIE

576.8.097

Rezumat. — Se descrie o metodă de analiză imunoelectroforetică în gel de agaroză, care folosește antigene și anticorpi marcați cu o substanță fluorescentă (izotiocianatul de fluoresceină).

Metoda poate fi aplicată la : identificarea în spectrul imunoelectroforetic a tipurilor principale de anticorpi, evidențierea reacțiilor neprecipitante și studierea zonelor de combinare pe diferite fragmente de anticorpi.

Prin fluoro-imunoelectroforeză s-au pus în evidență anticorpii de tip γ G în răspunsul primar, s-a dovedit capacitatea anticorpilor antialbumină de a lega un fragment neprecipitant de albumină, s-a urmărit compoziția și mobilitatea electroforetică a complexelor imune solubile și s-a dovedit capacitatea lanțurilor H de a lega antigenul corespondent.

Imunoelectroforeza este una dintre cele mai sensibile metode analitice pentru caracterizarea și testatea purității proteinelor și polizaharidelor [1]. Cu ajutorul analizei imunoelectroforetice este posibil să se realizeze printr-o singură operație identificarea și caracterizarea unui component prin trei parametri : mobilitatea electroforetică, specificitatea imunochimică și reactivitatea chimică (inclusiv activitatea enzimatică [2]). Pe lîngă aceste avantaje, metoda are și o limitare importantă, deoarece ea nu se aplică decît la analiza acelor substanțe care sînt capabile să participe la o reacție de precipitare de tip antigen-anticorp [1]. Or, există destule situații experimentale în care, deși antigenul se unește cu anticorpul specific, totuși nu se obține un precipitat vizibil (reacții imune neprecipitante). Lipsa precipitării poate fi determinată de o concentrație scăzută de anticorpi în antiserul folosit (sub 6 μg/ml [3]), de prezența în antiser a unor anticorpi cu o singură zonă de combinare (univalenți) sau de structura particulară a antigenului studiat. Ultima situație intervine la proteine, ca insulina de exemplu [4], capabile să declanșeze sinteza anticorpilor, însă incapabile să formeze cu aceștia un precipitat imun.

Oricare ar fi cauzele care le provoacă, reacțiile imune neprecipitante se sustrag analizei imunoelectroforetice. Metoda fluoro-imunoelectroforezei (FIE)*, descrisă în această lucrare, are ca scop extinderea analizei imuno-

* Termenul de fluoro-imunoelectroforeză a mai fost folosit recent de R. J. Schen și M. Rabinovitz [5], însă în alt sens. Acești autori numesc FIE o tehnică de colorare fluorescentă a lipoproteinelor serice cu ajutorul tetraciclinei.

electroforetice și în sfera reacțiilor neprecipitante. Metoda propusă se bazează pe folosirea antigenelor sau a anticorpilor marcați cu substanțe fluorescente [6] în variante experimentale care permit nu numai studiul componenților ce dau reacții neprecipitante, dar și realizarea unor performanțe noi, ca identificarea în spectrul imunoelectroforetic a tipurilor principale de anticorpi.

Sub aspect metodologic, FIE este analogă radio-imunoelectroforezei (RIE) [7], avînd față de aceasta din urmă avantajul de a fi mai rapidă și de a nu necesita operațiile speciale pe care le reclamă manipularea izotopilor radioactivi. Aplicarea FIE este posibilă și datorită folosirii gelului de agaroză [8], [9], care, nefiind încărcat electric, permite îndepărtarea ușoară a excesului de reactanți fluorescenți.

MATERIALE ȘI METODE

Antigene și antiseruri. S-au folosit ca antigene albumina serică umană izolată și purificată după metoda lui S. E. Michael [1] și serul uman normal.

Serul imun antialbumină umană s-a preparat pe iepuri prin injectarea săptămînală, repetată timp de 4—6 săptămîni, a 10 mg de albumină serică umană (N.B.C.) în asociație cu adjuvant Freund complet.

Pentru detectarea anticorpilor timpurii s-au injectat o singură dată doi iepuri, fiecare cu cîte 0,3 ml de ser uman normal (~20 mg de proteină) în asociație cu hidroxid de aluminiu. Animalele s-au sîngerat la 2, 3, 5 și 6 zile de la injectare.

Ca seruri imune antiiepure s-au folosit seruri de capră și de cobai, obținute prin injectarea repetată la aceste animale a serului de iepure total sau a fracțiunii sale globulinice. S-a utilizat de asemenea un ser imun de măgar anti-γ-globulină de iepure (~1,5 mg/ml de anticorp), obținut de la Institutul Gamaleia din Moscova prin bunăvoința dr. R. S. Nezlin.

Fluorocromarea antigenelor și anticorpilor. Albumina serică umană și serul uman normal integral au fost fluorocromați cu izotiocianat de fluoresceină (Fluka) la pH 9,0, 0,05 M (tampon carbonat), folosind un raport de 0,04 mg de fluorocrom/1 mg de proteină și o concentrație proteică de aproximativ 2 g%. Fluorocromarea s-a efectuat la 4°C timp de 16 ore.

Anticorpii de iepure antialbumină umană au fost obținuți din serul imun prin precipitare cu sulfat de amoniu 33%, dializă și liofilizare. Fluorocromarea anticorpilor s-a efectuat în condițiile descrise mai sus. Atît antigenele, cît și anticorpii marcați s-au eliberat de fluorocromul nereacționat prin filtrare pe Sephadex G—50, folosind pentru eluție o soluție de NaCl 0,145 M.

Imunoelectroforeza. S-a folosit microtehnica [11] în următoarele condiții: gel de agaroză (IBF) 1g%, tampon veronal-veronal sodic pH 8,6. Puterea ionică în cuvă a fost de 0,05, iar în plăci de 0,016. Potențialul aplicat a variat între 8 și 10 v/cm, intensitatea n-a depășit 0,8 mA/cm, iar durata separărilor a fost în general de două ore; cazurile în care analiza a durat mai mult sînt menționate în text.

Spălarea plăcilor s-a efectuat cu o soluție de NaCl 0,145 M, tamponată la pH 8,0 cu fosfați 0,02 M și care conține 0,01% tiomersal. După spălare, plăcile se mai imersau pentru 1—2 ore în apă distilată și apoi erau uscate prin aplicarea unei hîrtii de filtru Whatmann 1 pe suprafața gelului.

Înainte de examenul și fotografia în ultraviolet, plăcile se pot imersa într-o soluție de etanol 60°, ce conține acid acetic 2%. Se freacă ușor suprafața gelului cu degetul pentru a îndepărta scamele de hîrtie de filtru rămase pe suprafața gelului care, prezentînd o fluorescență albastră, scad calitatea fotografiilor.

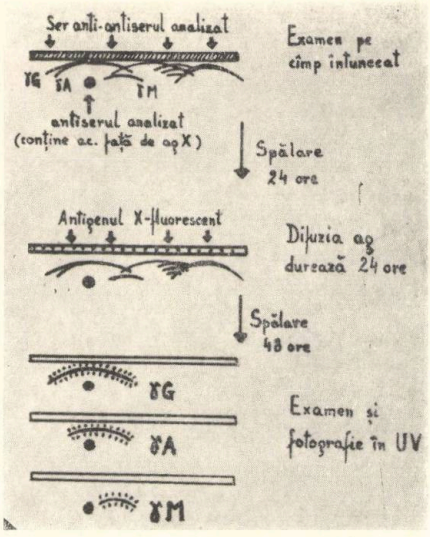


Fig. 1. — Schema de lucru pentru identificarea FIE a tipului de anticorp dintr-un antiser dat.

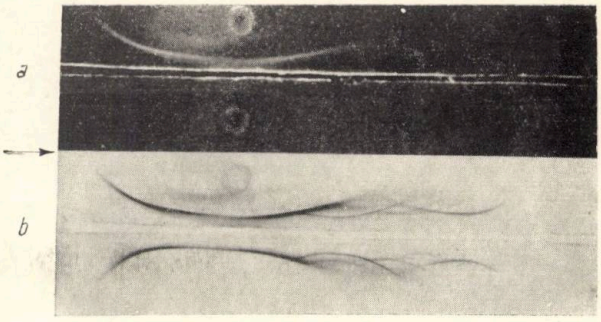


Fig. 2. — Diagramă FIE pentru identificarea tipului de anticorp în serul de iepure antialbumină umană.

a. Fotografie în UV. *b*. Fotografie după colorare cu azocarmin. În godeul superior s-a introdus serul de iepure norma (neimunizat), iar în godeul inferior s-a aplicat serul de iepure antialbumină. În șanț s-a introdus serul de măgar anti γ-globulină de iepure (difuzie 24 de ore), apoi după o spălare de 24 de ore, albumină fluorescentă (0,5%) (difuzie 24 de ore).

Fig. 3. — Schema de lucru pentru evidențierea directă a reacțiilor imune neprecipitante.

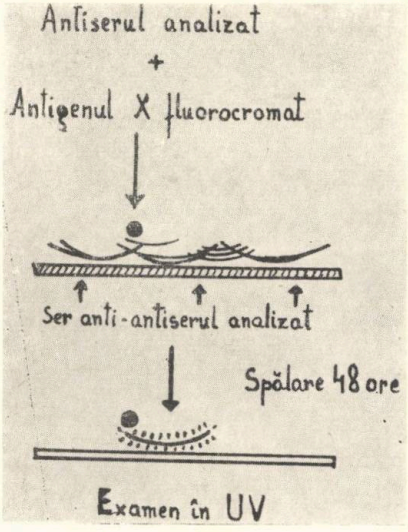
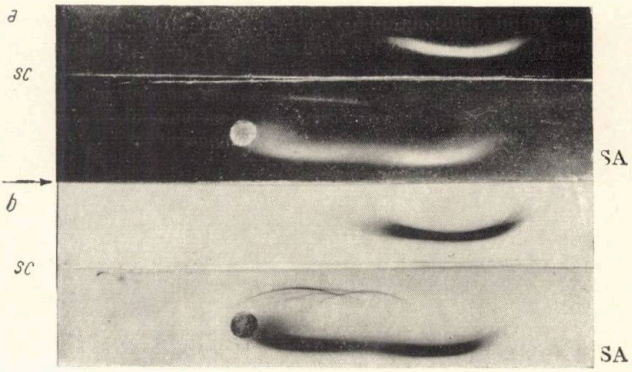


Fig. 4. — Diagrama FIE a complexului imun solubil albumină umană fluorescentă-ser de iepure antialbumină.

a. Fotografia în UV. b. Fotografia în vizibil. În godeul superior s-a introdus albumină fluorescentă, iar în cel inferior complexul imun fluorescent. În șanțul superior s-a introdus ser de iepure, antialbumină (SA) iar în șanțul inferior ser de capră antiiepure (SC).



capacitatea de a precipita serul de om într-o reacție de dublă difuzie de tip Ouchterlony și că această proprietate apare deja în ziua a 6-a de la inoculare.

II. Evidențierea reacțiilor neprecipitante

Antigenele care sînt capabile să se unească cu anticorpii specifici fără a da o reacție de precipitare pot fi evidențiate prin FIE cu ajutorul schemei experimentale prezentate în figura 3.

Am verificat eficiența acestei scheme folosind modelul nostru experimental albumină-ser antialbumină. În acest scop am realizat un complex solubil albumină fluorescentă-antialbumină, amestecînd cei doi reactanți într-o proporție astfel aleasă ca să se asigure un exces de antigen (fig. 4).

Din diagramele FIE se observă : serul de iepure antialbumină detectează două zone fluorescente ; cea cu viteză de migrare mai mare corespunde excesului de albumină, iar cealaltă corespunde complexului imun albumină fluorescentă-anticorpi specifici de iepure. Acest ultim fapt este dovedit prin menținerea liniei fluorescente în această zonă și atunci cînd complexul imun este analizat cu un ser de capră antiiepure. Este evident că linia corespunzătoare γG-globulinelor de iepure este slăbită datorită antrenării anticorpilor în zona de migrare a complexului imun (fig. 4, *b*).

Evidențierea reacțiilor neprecipitante poate fi realizată și printr-o tehnică indirectă, care presupune formarea prealabilă a liniilor de precipitare și apoi difuzarea antigenului fluorescent (vezi fig. 1). Această posibilitate am dovedit-o folosind un fragment fluorescent din molecula de albumină, capabil să se combine cu anticorpii antialbumină fără a produce o reacție de precipitare vizibilă. În acest scop am ales din hidrolizatul peptic fragmentul II, a cărui filtrare pe o coloană de Sephadex G-25 este întîrziată, deci care poate avea o greutate moleculară în jur de 5 000 (fig. 5).

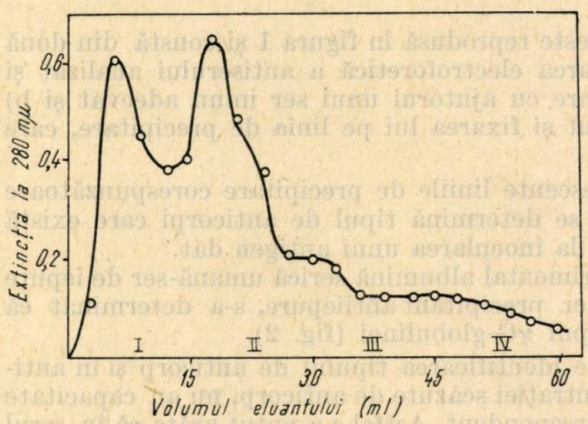


Fig. 5. — Separarea pe coloană de Sephadex G-25 a hidrolizatului peptic de albumină fluorescentă. Fluție cu NaCl 0,145 M ; toate probele au fost fluorescente.

Acest fragment nu dă naștere la o reacție de precipitare vizibilă dacă se pune în contact cu serul de iepure antialbuminic, dar are capacitatea să se unească cu anticorpii antialbuminici cuprinși în acest antiser, așa cum o dovedește diagrama FIE reprezentată în figura 6.

Această experiență arată că tehnica indirectă poate servi la fel de bine ca și tehnica descrisă înainte (fig. 4) la evidențierea reacțiilor neprecipitante. Oricare din aceste două tehnici FIE poate fi aplicată la detectarea

anticorpilor antiinsulinici, care nu precipită direct insulina [17] şi care în mod obişnuit se studiază prin RIE [4], [7].

Aplicarea metodei FIE presupune că prin fluorocromare proteina studiată nu-şi modifică structura antigenică şi este capabilă să reacţioneze la fel de bine ca şi antigenul nefluorocromat cu anticorpii corespunzători. Această presupunere este valabilă pentru majoritatea antigenelor, în sensul că prin fluorocromare aceştia îşi păstrează capacitatea de a reacţiona cu anticorpii specifici [6], [14]. Totuşi, într-o reacţie de imunoprecipitare în gel la care participă simultan antigenul fluorescent şi cel nefluorescent se constată că linia de precipitare formată este nefluorescentă deoarece în precipitatul imun se include cu preferinţă antigenul nefluorescent. Această comportare poate fi valorificată pentru demonstrarea specificităţii unor linii de precipitare.

III. FIE cu anticorpi fluorescenţi (tehnica sandviş)

Pentru cazurile în care structura antigenică a proteinei studiate ar fi alterată prin fluorocromare sau în situaţia în care nu se dispune decît de o cantitate de antigen prea mică pentru a putea fi fluorocromată, se poate recurge la o altă tehnică FIE, în care se utilizează anticorpi fluorescenţi. În acest procedeu, antigenul nefluorescent este cuprins între două straturi de anticorp, unul nefluorescent şi altul fluorescent (sandviş).

Schema aplicării tehnicii sandviş este redată în figura 7.

Ea poate fi aplicată atît la localizarea anticorpilor în spectrul imunoelectroforetic, cît şi la evidenţierea reacţiilor neprecipitante.

Eficienţa tehnicii sandviş a fost verificată tot cu ajutorul sistemului albumină-antialbumină. După migrarea electroforetică a serului de iepure antialbumină, s-au format liniile de precipitare introducînd în şanţul central ser de capră sau de cobai antiiepure. După spălare s-a tăiat şi umplut şanţul suplimentar cu albumină nefluorocromată (0,2 g%). După o difuzie de 24 de ore şi spălare, se introduc în şanţul central anticorpii fluorescenţi izolaţi din serul de iepure antialbumină.

Albumina nemarcată nu se poate introduce în acelaşi şanţ cu anticorpii fluorescenţi, deoarece ea nu poate fi îndepărtată complet şi precipită anticorpii adăugaţi ulterior. Datorită acestui fapt, anticorpii fluorescenţi nu mai pot difuza în cantitate suficientă pînă la linia de precipitare care a fixat antigenul nefluorescent şi astfel fluorescenţa este greu vizibilă. Se poate eventual renunţa la folosirea şanţului suplimentar în cazurile în care se studiază reacţii neprecipitante.

IV. Evidenţierea prin FIE a fragmentelor de anticorpi capabile să lege antigenul

Deoarece fragmentarea anticorpilor prin hidroliză enzimatică sau reducere chimică determină apariţia unor componente capabile să dea linii de precipitare caracteristice cu un ser imun anti-γ-globulină, este posibil ca prin aplicarea FIE să se cerceteze care din aceste componente sînt capabile să lege antigenul corespondent.

Astfel, un hidrolizat papainic de anticorpi de iepure antialbumină, supus analizei imunoelectroforetice cu ser de măgar anti-γ-globulină de

iepure, prezintă două linii de precipitare : una corespunzătoare fragmentelor Fab (linia mai lungă) și alta corespunzătoare fragmentului Fc (linia mai scurtă din zona γG-globulinei intacte) (fig. 8 *b*).

Dacă după difuzia albuminei fluorescente s-a examinat placa în ultraviolet, s-a constatat că numai linia lungă corespunzătoare fragmentului Fab devine fluorescentă (fig. 8 *a*). Această comportare concordă cu datele din literatură, care au dovedit că zona de combinare a anticorpilor este localizată pe fragmentul Fab [18].

O experiență similară s-a efectuat cu lanțurile polipeptidice grele și ușoare izolate dintr-un preparat de anticorpi antialbumină redus și alchilat. S-a constatat că numai linia de precipitare corespunzătoare lanțului greu H devine fluorescentă, lanțul ușor L fiind incapabil să lege albumina fluorescentă (fig. 9).

Aceste rezultat este în acord cu datele obținute de J. Fleischman, R. Porter și E. Press [19] și de S. Utsumi și F. Karush [20), care, aplicînd metode diferite, au demonstrat că zona de combinare este asociată cu lanțul H. La aceeași concluzie a ajuns și M. Sela [21] utilizînd fragmente de antigen radioactiv capabile să rămînă legate de zona de combinare a anticorpului.

Dacă se amestecă preparatele ce conțin lanțurile L și H, se obține o linie de precipitare a cărei poziție corespunde cu cea a γG-globulinei inițiale (fig. 9). Pe această linie se fixează o cantitate mai mare de albumină fluorescentă decît pe linia corespunzătoare lanțului H, deși cantitatea lanțului H a scăzut (fig. 9). Această comportare arată că lanțul L, deși nu fixează direct antigenul, influențează capacitatea de legare a lanțului H, fapt semnalat pe alte căi experimentale și de alți cercetători [22], [23], [24]. Experiențele noastre efectuate prin FIE par să întărească concepția lui F. Karush și S. Utsumi [25] că zona de combinare este asociată exclusiv de lanțul H și că lanțul L contribuie numai indirect la reactivitatea imunologică prin aceea că împiedică agregarea sau denaturarea lanțului H.

V. Alte aplicații ale FIE

Tehnica FIE poate fi aplicată și la studierea reacțiilor precipitante În acest caz se utilizează anticorpi fluorescenți și se obține o imagine imunoelectroforetică în care toate liniile de precipitare sînt fluorescente. Folosind acest procedeu, examenul în UV nu decelează de obicei mai multe linii de precipitare decît se pot vedea prin examenul obișnuit pe fond întunecat sau după colorare. Procedeul poate prezenta totuși unele avantaje în cazurile în care se studiază comparativ mai multe antiseruri polivalente care posedă un număr variabil de anticorpi.

FIE poate fi aplicată și la detectarea antigenelor fluorescente prezente într-un amestec proteic complex. Antigenul fluorescent urmărit se va distinge de celelalte antigene prin fluorescența liniei sale de precipitare. De aceea, tehnica FIE poate fi întrebuințată la detectarea proteinelor fluorescente injectate în animale. Cu această metodă se pot studia distribuția și catabolizarea proteinelor fluorescente la nivelul umorilor, organelor, celulelor și chiar al fracțiunilor subcelulare [26]. Astfel, prin perfuzie pe cale arterială a intestinului de șobolan cu o soluție de albumină fluorescentă,

Fig. 6. — Detectarea prin FIE a capacității fragmentului peptic II fluorescent de a se combina cu anticorpii antialbumină.

a. Fotografie în UV. *b*. Fotografie după colorare cu amidoschwarz. În godeu s-a aplicat serul de iepure antialbumină, iar în șanț s-a introdus serul de măgar anti-γ globulină de iepure pentru 24 de ore, spălare 24 de ore și apoi introducerea soluției fragmentului II fluorescent concentrat la 1/3 din volumul inițial prin perevaporare.

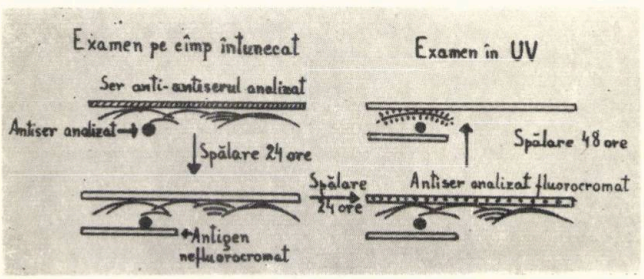


Fig. 7. — Schema pentru aplicarea tehnicii sandviș la detectarea reacțiilor neprecipitante.

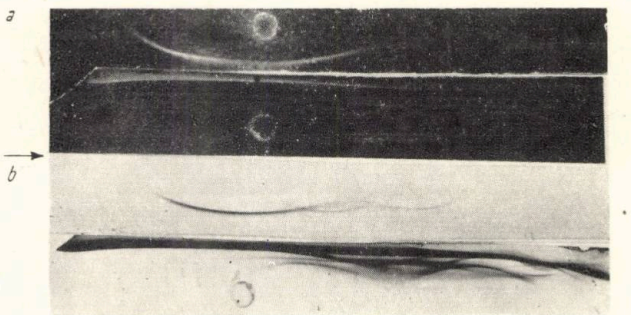


Fig. 8. — Fixarea albuminei fluorescente de către hidrolizatul papainic al anticorpilor de iepure antialbumină.

a. Fotografie în UV. *b*. Fotografie după colorare cu amidoschwarz. În godeul superior s-a introdus un preparat de anticorpi intact, iar în cel inferior anticorpi hidrolizați cu papaină. În șanț s-a introdus serul de măgar anti γ-globulină de iepure (difuzie 24 de ore) și apoi după o spălare de 24 de ore, albumina fluorescentă (0,5 g%) (difuzie 24 de ore).

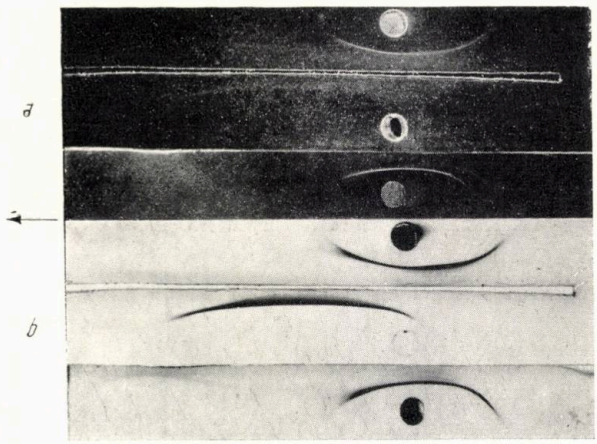


Fig. 9. — Fixarea albuminei fluorescente de către lanțurile polipeptidice L și H și amestecul lor provenit din anticorpii de iepure antialbumină.

a. Fotografie în UV. *b*. Fotografie după colorare cu amidoschwarz. S-au introdus : în godeul superior lanțul H, în godeul din mijloc lanuț L, iar în godeul inferior L + H. În șanțuri s-a introdus serul de măgar anti γ-globulină de iepure (difuzie 24 de ore) și apoi după o spălare de 24 ore, albumina fluorsscentă (0,5 g%).

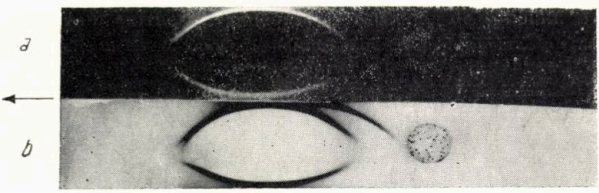


Fig. 10. — Identificarea prin FIE a albuminei fluorescente într-un extract de mucoasă intestinală de șobolan.

a. Fotografie în UV. *b*. Fotografie după colorare cu amidoschwarz. În godeu s-a introdus extractul, iar în șanț serul de iepure antialbumină.

s-a putut detecta la nivelul citoplasmei celulelor de mucoasă intestinală prezența albuminei (fig. 10).

Linia de precipitare ce apare în urma liniei fluorescente este rezultatul unei reacții nespecifice între serul de iepure antialbumină și un component din celulele mucoasei intestinale.

CONCLUZII

Metoda FIE permite efectuarea a trei operații principale, inaccesibile metodei imunoelectroforetice clasice, și anume:

a) evidențierea reacțiilor neprecipitante;

b) identificarea tipului de anticorp dintr-un antiser dat;

c) localizarea zonelor de combinare în diferite fragmente ale anticorpilor.

Prezentat la redacție
la 21 aprilie 1966

Institutul de biochimie al Academiei Republicii Socialiste România

BIBLIOGRAFIE

1. P. Grabar, *Immunoelectrophoretic analysis*, în *Immunological methods*, Edited by J.F. Ackroyd, Blackwell, Oxford, 1964, p. 79.
2. J. Uriel, *Characterization of enzymes in specific immuneprecipitates*, Ann. N.Y. Acad. Sci., **103**, 956 (1963).
3. J. Marrack, *Sensitivity and specificity of methods of detecting antibodies*, Brit. med. Bull., **19**, 178 (1963).
4. Y. Yagi, P. Maier, D. Pressman, *Two different anti-insulin antibodies in guinea pig antisera*, J. Immunol., **89**, 442 (1962).
5. R.J. Schen, M. Rabinovitz, *The affinity of tetracycline for human serum lipoproteins demonstrated by fluoroimmunoelectrophoresis*, Israel J. med. Sci., **2**, 86 (1966).
6. R.C. Nairn, *Fluorescent protein tracing*, Livingstone, Edinburgh and London, 1962, p. 1—46.
7. Y. Yagi, P. Maier, D. Pressman, *Immunoelectrophoretic identification of guinea pig anti-insulin antibodies*, J. Immunol., **89**, 736 (1962).
8. S. Hjertén, *Agarose as an anticonvectional agent in electrophoresis*, Biochim. biophys. Acta, **53**, 518 (1961).
9. V. Gheție, D. Moțet, *Electroforeza și imunodifuzia proteinelor în gel de agaroză*, St. cerc. biochim., **5**, 409 (1962).
10. S.E. Michael, *The isolation of albumin from blood serum or plasma by means of organic solvents*, Biochem. J., **82**, 212 (1962).
11. J.J. Scheidegger, *Une micro-méthode de l'immunoélectrophorèse*, Int. Arch. Allergy, **7**, 103 (1955).
12. M. Kaminski, C.E. Tanner, *Étude comparative, par électrophorèse en gélose et immunoélectrophorèse, de la dégradation de la sérumalbumine humaine par la pepsine, la trypsine et la chymiotrypsine*, Biochim. biophys. Acta, **33**, 10 (1959).
13. C. Șelariu, V. Gheție, S. Mihăescu, *Hidroliza cu papaină a γ_2-globulinelor și anticorpilor fluorescenți de iepure*, St. cerc. biochim., **8**, 89 (1965).
14. S. Mihăescu, *The distribution of fluorescent dyes in the rabbit γ G-globulin molecule*, Rev. roum. biochim., în press.
15. J.B. Fleischman, R.H. Pain, R.R. Porter, *Reduction of γ-globulin*, Arch. Biochem. Biophys., Suppl. 1, 174 (1962).
16. M.J. Freeman, A.B. Stavitsky, *Radioimmunoelectrophoretic study of rabbit anti-protein antibodies during the primary response*, J. Immunol., **95**, 981 (1966).
17. Y. Yagi, P. Maier, D. Pressman, *Antibodies against the component polypeptide chains of bovine insuline*, Science, **147**, 617 (1965).
18. A. Nisonoff, G.J. Thorbecke, *Immunochemistry*, Ann. Rev. Biochem., **33**, 355 (1964).

19. J.B. Fleischman, R.R. Porter, E.M. Press, *The arrangement of the peptide chains in γ-globulin*, Biochem. J., **88**, 220 (1963).
20. S. Utsumi, F. Karush, *Immunochemical properties of the subunits of rabbit gamma-globulin*, Fed. Proc., **23**, 454 (1964).
21. M. Sela, *Emploi des polypeptides synthétiques dans l'étude de l'antigénicité*, Bull. Soc. Chim. biol., **46**, 1 685 (1964).
22. F. Franek, R.S. Nezlin, *Recovery of antibody combining activity by interaction of different peptide chains isolated from purified horse antitoxins*, Folia microbiol., **8**, 128 (1963).
23. G.M. Edelman, D.E. Ollins, J.A. Gally, N.D. Zinder, *Reconstitution of immunologic activity by interaction of polypeptide chains of antibodies*, Proc. nat. Acad. Sci. Wash., **50**, 753 (1963).
24. O. Roholt, K. Onoue, D. Pressman, *Specific combination of H and L chains of rabbit γ-globulins*, Proc. nat. Acad. Sci, Wash., **51**, 173 (1964).
25. F. Karush, S. Utsumi, *The subunits of purified antibody*, în *Molecular and cellular basis of antibody formation*, Publ. House Czech. Acad. Sci., Prague, 1965, p. 145.
26. V. Gheție, C. Medeșan, N. Șt. Chișiu, date nepublicate.

ST. CERC. BIOCHIM., 9, 4, 367–376 (1966)

PARTICIPAREA ÎN METABOLISMUL MUSCULAR A AMINOACIZILOR LIBERI INTRACELULARI

DINU TĂNĂSESCU*

577.12

Rezumat. — A fost urmărită, în urma stimulărilor electrice ale mușchilor, variația nivelului aminoacizilor liberi intracelulari totali și individuali.

S-a constatat o scădere a nivelului aminoacizilor totali în urma stimulărilor electrice de scurtă durată (30 s, 1 și 3 min.). După un repaus de 30 s și, mai ales, de 1 min, nivelul aminoacizilor liberi din mușchii stimulați 30 s. și 1 min crește peste acela din mușchii în repaus.

În urma stimulărilor de lungă durată (15, 30 și 60 min), cu excepția unor creșteri constatate după stimulări de 15 min, nivelul aminoacizilor scade.

Cromatografic au fost identificați 15 aminoacizi (în afară de carnozină și glutation), predominînd următorii : lizina, glicocolul, acidul glutamic, glutamina, alanina, serina, arginina și leucina.

Variația aminoacizilor individuali, separați cromatografic, este în funcție de timpul de stimulare și de durata de repaus. Variațiile cele mai evidente au fost constatate în cazul alaninei, glicocolului, argininei și glutaminei.

Un aspect mai puțin cercetat al metabolismului muscular, deși de o reală importanță, este acela al „fondului" de aminoacizi liberi intracelulari [1]. Este cunoscut faptul că H-meromiozina, actina, precum și marea majoritate a enzimelor glicolitice, se sintetizează din aceiași precursori, adică dintr-un fond comun de aminoacizi [2]. De asemenea, în ultimii ani au început să apară lucrări care au pus în evidență faptul că unii aminoacizi își modifică concentrația în urma stimulării electrice a mușchilor, ceea ce atestă participarea lor directă la procesul contracției musculare [3–5]. Cercetările efectuate în această direcție sînt însă sporadice și nu au făcut decît să prezinte în mod destul de vag rolul jucat în procesul complex al metabolismului muscular de o serie de aminoacizi, ca de exemplu lizina, glutamina, arginina, acidul glutamic etc.

Aceste considerente ne-au determinat să lărgim sfera cercetărilor noastre anterioare cu privire la rolul esențial al glicolizei [6–8] în biochimismul muscular cu acela mai puțin cunoscut al aminoacizilor liberi intra-celulari. În cercetarea de față am urmărit, în cursul stimulării electrice a mușchilor gastrocnemieni de broască, variațiile cantitative atît ale aminoacizilor totali, cît și ale celor individuali, după separarea lor cromatografică pe hîrtie.

---

* Asistență tehnică — T. Benția.

MATERIALE ŞI METODE

Metodologia. Experienţele au fost efectuate pe muşchi gastrocnemieni de broască (*Rana ridibunda*), izolaţi cu grijă pentru evitarea oricărui traumatism.

Imediat după excizare, muşchii au fost păstraţi timp de 10 min la temperatura camerei, într-o soluţie Ringer-Camis [9—10] cu următoarea compoziţie : NaCl 6,3% $_0$, KCl 0,25% $_0$, $CaCl_2$ 0,25% $_0$, $NaHCO_3$ 0,15% $_0$.

Contracţiile izotonice au fost efectuate cu ajutorul unui stimulator electric, cu 5 impulsuri pe secundă, la 0,8 mA şi 5 mS, muşchii fiind imersaţi în soluţia Ringer-Camis. Imediat după efectuarea ultimei contracţii sau după păstrarea în repaus un timp variat, muşchii au fost îngheţaţi rapid cu azot lichid (— 160°C) şi apoi mojaraţi. După îndepărtarea atentă a ţesutului conjunctiv, praful de muşchi (0,3—0,5 g) a fost cîntărit în eprubete de centrifugă de 10 ml, în prealabil tarate şi răcite. Omogenizarea s-a făcut în aceleaşi eprubete de centrifugă, prin adaptarea unui piston de sticlă etanş, cu o soluţie de acid tricloracetic 20% . Proteinele precipitate au fost centrifugate timp de 15 min la 5 000 g, iar supernatantul perfect limpede a fost trecut pe o coloană schimbătoare de ioni.

Muşchii pereche nestimulaţi au fost prelucraţi în mod absolut identic şi au fost consideraţi martori. Datele obţinute pe muşchii stimulaţi au fost comparate cu acelea obţinute la muşchii martori.

Absorbţia aminoacizilor pe coloana de Zerolit 225. Aminoacizii liberi din soluţia tricloracetică au fost reţinuţi pe o coloană de Zerolit 225 (SRC 10) 4—5% DVB, 52—100 mesh, de 0,9 × 10 cm. Debitul de curgere a fost de 2 ml/min.

După introducerea probelor s-au adăugat 50 ml de apă distilată pentru îndepărtarea substanţelor nereţinute (ioni, glucide, acizi organici, lipide etc.), iar eluţia aminoacizilor reţinuţi de răşină a fost efectuată cu 30 ml dintr-o soluţie de amoniac 5% . Soluţia amoniacală, prinsă cantitativ în capsule de sticlă, a fost evaporată la sec pe o baie de apă. Reziduul, perfect alb şi cu aspect cristalin, a fost reluat cu 3—5 ml de apă distilată şi evaporat din nou pentru îndepărtarea urmelor de amoniac, operaţie care a fost repetată de două ori.

După eluţia aminoacizilor, coloanele de Zerolit au fost regenerate trecîndu-se succesiv 25 ml de apă distilată, 50 ml de HCl N şi apoi apă distilată pînă la reacţie neutră ; după această ultimă operaţie, coloanele erau din nou gata pentru o viitoare analiză. Coloanele pot fi întrebuinţate cu acelaşi randament un timp practic nelimitat, dacă se respectă condiţiile de regenerare.

Iniţial, răşina a fost tratată în modul următor : a fost suspendată în apă distilată, iar după depunerea particulelor apa a fost îndepărtată, operaţie repetîndu-se pînă la obţinerea unui supernatant perfect limpede. S-a adăugat apoi un volum de NaOH N de trei ori mai mare decît acela al răşinii sedimentate şi s-a ţinut pe o baie de apă timp de 3 ore, soluţia de NaOH fiind schimbată la fiecare oră cu un volum egal cu cel iniţial, fierbinte. După răcire, răşina s-a spălat cu apă distilată pe o pîlnie Büchner pînă la reacţie neutră. Răşina astfel tratată a fost introdusă în tuburile de sticlă umplute cu apă distilată. După sedimentarea fermă a răşinii se trec 50 ml de HCl N pentru transformarea în ciclul H^+, produsul fiind iniţial în ciclul Na^+, şi apoi apă distilată pînă la reacţie neutră ; răşina este astfel gata pentru începerea analizelor.

Dozarea aminoacizilor totali a fost efectuată după tehnica descrisă de Stein şi Moore [11]. Reziduul din capsulă a fost reluat cu 5 ml de izopropanol 10% şi s-au luat probe de 0,1, 0,2 şi 0,3 ml, care au fost aduse la 1 ml cu apă distilată. Atunci cînd dozarea aminoacizilor totali s-au făcut din probele care ulterior s-au cromatografiat, cantităţile analizate au fost de 0,01 şi 0,02 ml capsula fiind reluată cu 0,3 ml de izopropanol 10% . După adăugarea a 0,5 ml din reactivul cu ninhidrină (0,5 g de ninhidrină, 0,075 g de hidrinden, dizolvate în 18,75 ml de metilcelosolve, adăugîndu-se apoi 6,25 ml de tampon acetat 4 N pH 5,5),

eprubetele s-au ţinut 15 min pe o baie de apă în fierbere puternică. După răcirea eprubetelor s-a diluat cu 5 ml de alcool etilic 50%.

Fotometrarea s-a făcut la 570 mμ. Datele au fost raportate faţă de o curbă realizată cu leucină şi s-au exprimat în mg echivalenţi leucină la 100 g de muşchi.

Cromatografia pe hîrtie a aminoacizilor. Reziduul din capsule a fost reluat cu 0,3 ml de izopropanol 10% şi s-au aplicat probe de 50 μl pe hîrtie Whatman nr. 1 sau Schleicher Schull 2 043 b. Lichidul de irigare folosit a fost format din butanol : apă ; acid acetic glacial (11 : 11 : 3), efectuîndu-se, descendent, patru irigări succesive. Evidenţierea spoturilor a fost făcută prin pulverizare cu ninhidrină 0,3% în alcool etilic, iar dezvoltarea culorii a avut loc la temperatura camerei şi la întuneric.

Pentru precizarea identificării spoturilor au fost efectuate reacţii specifice pentru următorii aminoacizi : histidină, arginină, serină, treonină, prolină şi tirozină [12—14]. Pe fiecare coală de hîrtie cromatografică au fost aplicate probe (10 μl) pe aminoacizi martori (M/100)

DOZAREA CANTITATIVĂ A AMINOACIZILOR INDIVIDUALI DUPĂ SEPARAREA LOR PRIN CROMOTOGRAFIA PE HÎRTIE

După 16 ore de la pulverizarea cu ninhidrină, dezvoltarea culorii avînd loc la întuneric şi la temperatura camerei, spoturile individuale ale aminoacizilor, precum şi martorii respectivi, s-au decupat şi introdus în eprubete şi s-au transformat într-un complex cu cadmiu [15], care a fost ulterior eluat cu 3 ml de alcool metilic. Eprubetele s-au agitat puternic pentru a se face o eluţie perfectă a complexului, hîrtiile trebuind să rămînă complet albe, şi s-a fotometrat după 10 min la 540 mμ. Calculul s-a făcut în funcţie de extincţiile aminoacizilor martori, decupaţi de pe aceeaşi cromatogramă.

Materialele utilizate. Aminoacizii martori utilizaţi au fost procuraţi de la firma Calbiochem (S.U.A.), iar schimbătorul de ioni Zerolit 225 (SRC 10) de la firma Zerolit Limited (Anglia). Toate celelalte chimicale utilizate au fost chimic pure.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Efectul stimulărilor de scurtă durată asupra concentraţiei aminoacizilor totali. Pentru a putea preciza modul în care intervine fondul de aminoacizi liberi în metabolismul muscular era necesar, în primul rînd, să se constate dacă stimulările de scurtă durată — 30 s, 1 sau 3 min — produc variaţii ale conţinutului lor. Cunoaşterea acestui fapt era importantă, ştiut fiind că procesele glicolitice sînt mult crescute chiar din primele secunde ale activităţii musculare [16—17]. Variaţiile fondului de aminoacizi din muşchii stimulaţi ne precizează deci dacă aminoacizii liberi intervin sau nu direct în energetica musculară.

Din figura 1 se poate constata că stimulările de scurtă durată provoacă o uşoară scădere a aminoacizilor totali, în special după 1 min de stimulare. Această scădere faţă de valorile aminoacizilor din muşchii nestimulaţi, deşi nu este accentuată, ne face totuşi să presupunem că cel puţin unii aminoacizi participă direct în primele faze ale proceselor de contracţie musculară.

Făcînd o analogie cu variaţiile constatate în cazul acidului lactic, care, după cum se ştie, prezintă o creştere mai evidentă în perioada de relaxare, ceea ce reflectă o activitate glicolitică crescută, necesară refacerii

compușilor macroergici consumați [6], [18], am urmărit nivelul aminoacizilor totali după pauze de 30 s, 1 și 3 min de la încetarea stimulărilor

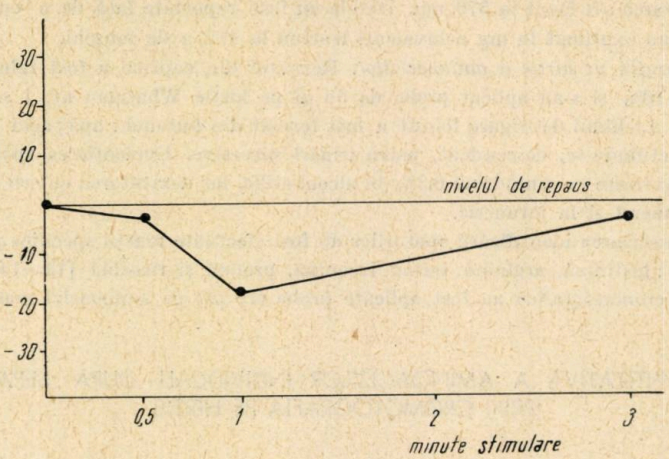


Fig. 1. — Variația aminoacizilor liberi totali în urma stimulărilor electrice de 20 s, 1 și 3 min.

R/S — diferența dintre valorile determinate în mușchii în repaus și cei stimulați. Fiecare punct reprezintă media a 7 determinări.

electrice efectuate timp de 30 s, 1 și, respectiv, 3 min. În figura 2 se pot urmări modificările survenite în aceste condiții. Se constată că

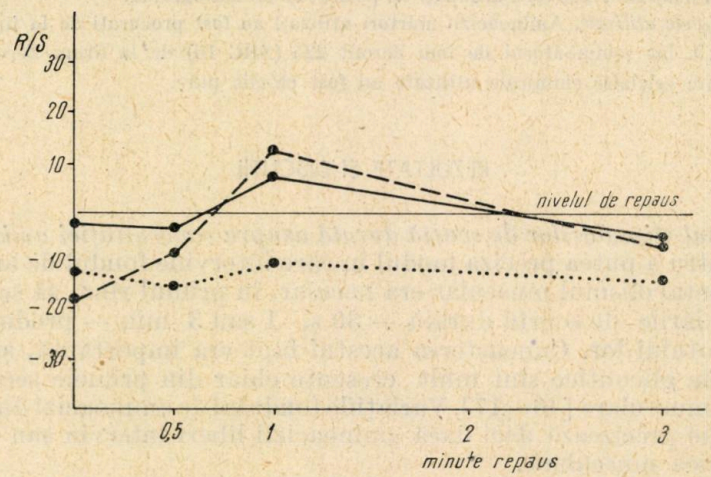


Fig. 2. — Variația aminoacizilor liberi totali din mușchii stimulați timp de 30 s, 1 și 3 min. și apoi lăsați în repaus 30 s, 1 și 3 min.

R/S — diferența dintre valorile determinate în mușchii în repaus și cei stimulați. Fiecare punct reprezintă media a 7 determinări.

——— = 30 s de stimulare;
– – – = 1 min de stimulare;
. . . . = 3 min de stimulare.

la stimulări de 30 s sau 1 min se produc scăderi ale aminoacizilor totali după pauze de 30 s și 3 min, dar creșteri după 1 min. Stimulările de

3 min atrag după sine scăderi ale nivelului aminoacizilor liberi, care persistă şi după pauzele respective.

Nu putem da o explicaţie precisă creşterii nivelului aminoacizilor, constatată la muşchii stimulaţi timp de 30 s sau de 1 min şi lăsaţi apoi în repaus timp de 1 min, dar presupunem că ea se datoreşte fie unei activităţi crescute a biosintezei unor aminoacizi, fie, mai degrabă, unei metabolizări mai accentuate a proteinelor sarcoplasmatice. Trebuie subliniat faptul că aceste creşteri se constată numai în urma unei pauze de 1 min, şi, de asemenea, că au loc numai în cazul stimulărilor de 30 s, respectiv 1 min. Revenirea la valorile normale după o pauză de 3 min

Tabela 1

Variaţia aminoacizilor totali din muşchi stimulaţi timp de 15, 30 şi 60 min şi dozaţi imediat R – muşchi în repaus; S – muşchi stimulat; Dif. – diferenţa dintre valoarea muşchilor în repaus şi a celor stimulaţi.
Valorile sînt exprimate în μg echivalenţi leucină/100g muşchi.

Exp. nr.	Timp de stimulare								
	15 min			30 min			60 min		
	R	S	Dif.	R	S	Dif.	R	S	Dif.
1	234	243	+ 9	185	166	−19	207	168	−39
2	185	216	+31	175	159	−16	196	125	−71
3	183	189	+ 6	204	182	−22	176	129	−47
4	188	238	+50	179	160	−19	183	153	−30
5	162	143	−21	213	184	−29	194	143	−51
Media	190	205	+15	191	170	−15	191	143	−48

ne dovedeşte că procesele care produc aceste creşteri sînt rapide şi de scurtă durată, deci că metabolizarea aminoacizilor are loc într-un ritm rapid.

Efectul stimulărilor electrice de lungă durată asupra concentraţiei aminoacizilor totali. Am considerat că cercetarea efectului produs de stimulările de lungă durată poate să ne aducă indicaţii asupra posibilităţilor pe care le are muşchiul în cazul unui efort prelungit. În aceste condiţii, glicoliza este mult scăzută, pentru a se împiedica epuizarea rezervelor de glicogen [19]. Necesităţile energetice sînt obţinute în acest caz pe alte căi metabolice, printre care, fără îndoială, sînt şi acelea unde participă unii aminoacizi.

Din tabela 1 se poate urmări variaţia aminoacizilor totali în urma stimulărilor de 15, 30 şi 60 min, muşchii fiind îngheţaţi imediat după efectuarea ultimei contracţii. Se constată în primul rînd că stimulările de 15 min atrag după ele creşteri nete ale valorilor aminoacizilor din muşchii stimulaţi, urmate, după 30 şi în special după 60 min de stimulare, de o scădere a concentraţiei aminoacizilor, mult sub aceea din muşchii în repaus. Dacă consumul constatat după o perioadă de 30, respectiv 60, min de stimulare se poate explica prin metabolizarea aminoacizilor care pot produce energie, creşterilor obţinute după 15 min nu le putem da deocamdată nici o explicaţie mulţumitoare.

Prin dozarea aminoacizilor totali din mușchii stimulați timp de 15, 30 sau 60 min și apoi lăsați în repaus timp de 15, 30 sau 60 min, se obțin observații interesante. Din figura 3 se poate vedea că sensul variațiilor

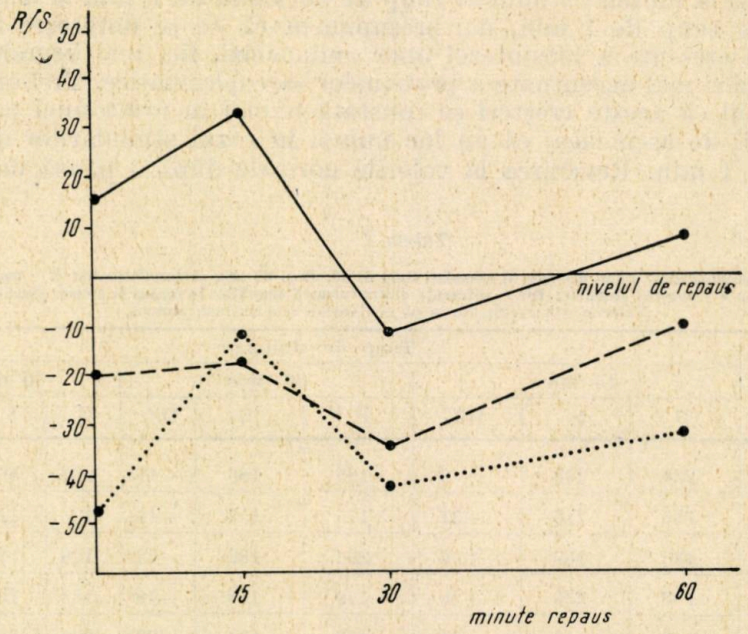


Fig. 3. — Variația aminoacizilor liberi totali din mușchii stimulați timp de 15, 30 și 60 min și apoi lăsați în repaus 15, 30 și 60 min.

R/S — diferența dintre valorile determinate în mușchii în repaus și cei stimulați. Fiecare punct reprezintă media a 7 determinări.

——— = 15 min de stimulare;
– – – = 30 min de stimulare;
. . . . = 60 min de stimulare.

este, în mare, asemănător după cele trei perioade de stimulare. Astfel, după pauzele de 15 min se produc creșteri care numai în cazul stimulărilor de 15 min sînt superioare valorilor de repaus, după pauzele de 30 min se constată scăderi, iar după acelea de 60 min reveniri spre valorile de bază sau mai crescute în cazul stimulărilor de 15 min.

În concluzie, putem afirma că în mușchii stimulați 30 și 60 min și înghețați imediat se produc scăderi marcate ale aminoacizilor totali, pe cînd după stimulările de 15 min se constată creșteri. Rezultă că procesele metabolice care au loc în mușchi sînt condiționate de durata efortului depus și de timpul de relaxare.

Compoziția aminoacizilor liberi intracelulari musculari. Pentru a avea o imagine mai clară despre modul în care aminoacizii liberi participă la aceste procese și, mai ales, pentru a putea ști care dintre ei participă direct, am efectuat dozări cantitative după separarea lor cromatografică.

În figura 4 este redată fotografia unei cromatograme, din care reiese că au putut fi identificați 15 aminoacizi liberi, predominînd lizina, acidul glutamic, glutamina, alanina, arginina, glicocolul, serina și leucinele.

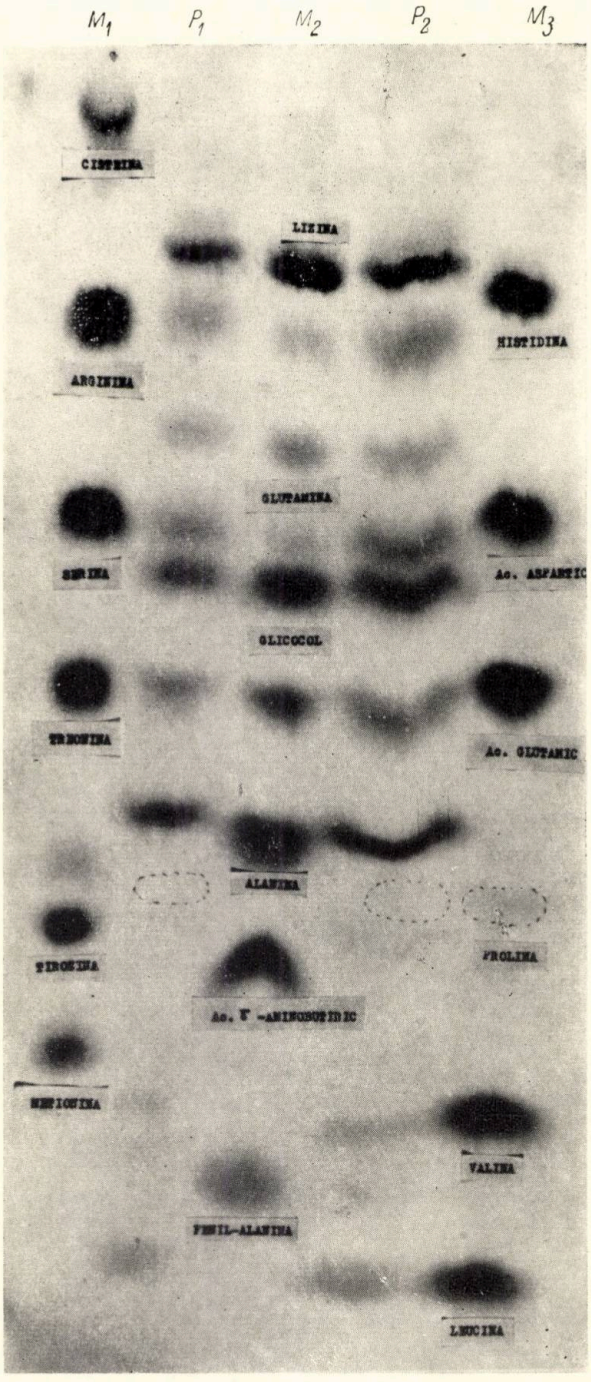


Fig. 4. — Fotografia unei cromatograme a aminoacizilor liberi musculari, M_1, M_2, M_3 — martori; P_1, P_2 — probe de concentrații diferite.

Sînt de remarcat concentraţiile ridicate ale lizinei şi argininei, doi aminoacizi bazici, fapt care trebuie legat de recenta observaţie a lui Scopes [20], care a semnalat existenţa unor proteine sarcoplasmatice, cu funcţii biologice încă neprecizate şi care au un puternic caracter bazic. De asemenea se constată absenţa histidinei libere, care se găseşte însă în muşchi într-o concentraţie deosebit de ridicată, intrînd în structura carnozinei. Subliniem acest fapt deoarece recent [21], datorită unei greşeli de inter-

Tabela 2

Concentraţia aminoacizilor liberi intracelulari. Valorile sînt exprimate în μM/g de muşchi şi reprezintă media a 7 determinări

Aminoacidul	μmoli/g de muşchi
Lizina	0,778
Arginina	0,145
Glutamina	0,658
Cisteina	0,005
Acidul glutamic	0,794
Serina	0,454
Acidul aspartic	0,051
Glicocolul	0,605
Alanina	0,881
Prolina	0,182
Valina	0,026
Tirozina	0,014
Fenil-alanina	0,017
Leucina + izoleucina	0,038
Treonina	0,021

pretare, s-a făcut afirmaţia că histidina s-ar afla sub formă liberă într-o concentraţie ridicată. Atragem de asemenea atenţia că, în urma absorbţiei pe Zerolit 225, Amberlit IR 120 sau pe Dowex 50, o cantitate redusă de carnozină se poate hidroliza generînd histidină liberă, ceea ce duce la confuzii şi afirmaţii eronate.

Concentraţiile aminoacizilor liberi intracelulari musculari, care sînt specifici acestui organ, fiecare ţesut avînd o compoziţie şi o concentraţie caracteristică [22—23], sînt redate în tabela 2. În afară de aminoacizii trecuţi în acest tabel, a mai fost identificat şi glutationul, care însă, fiind într-o concentraţie redusă, nu a fost dozat.

Variaţiile cantitative ale aminoacizilor liberi în urma stimulărilor electrice de lungă durată. Datorită faptului că variaţiile cele mai evidente ale fondului de aminoacizi au fost observate în urma unui efort prelungit, am urmărit variaţia individuală a aminoacizilor liberi după stimulări de 15, 30 şi 60 min., precum şi după pauze de 15, 30 şi, respectiv, 60 min.

Următorii aminoacizi au prezentat variaţii nete ale nivelului lor faţă de acela din muşchii în repaus: alanina, glicocolul, glutamina, lizina, arginina, serina şi acidul glutamic.

După cum reiese din figura 5, sensul variaţiilor depinde de natura aminoacidului, de timpul de stimulare şi de durata pauzei după care muşchiul a fost îngheţat şi analizat. Astfel, după o stimulare de 15 min., numai arginina, glicocolul şi glutamina prezintă creşteri în toate cele patru variante, cele mai mari creşteri observîndu-se în cazul glicocolului. Nivelul alaninei, lizinei şi al serinei creşte atît după stimulările de 15 min. şi în-

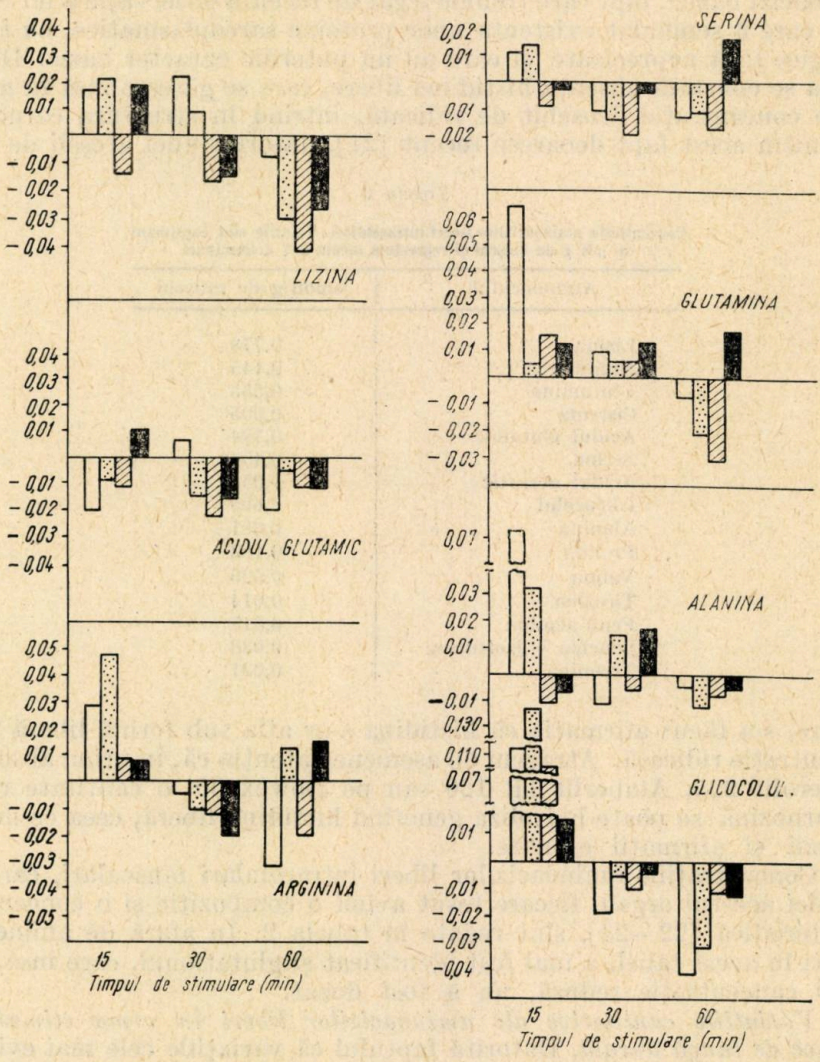


Fig. 5. — Variația aminoacizilor liberi după separarea lor cromatografică din mușchii stimulați 15, 30 și 60 min și apoi lăsați în repaus aceleași perioade de timp.

R/S — diferența dintre valorile determinate în mușchii în repaus și cei stimulați. Valorile sînt exprimate în μM/g de mușchi și reprezintă media a 5 determinări.

= înghețare imediată;
= înghețare după o pauză de 15 min;
= înghețare după o pază de 30 min;
= înghețare după o pauză de 60 min.

gheţare imediată, cît şi după pauzele de 15 şi 60 min, dar scade prin menţinerea în repaus 30 min. Faţă de tendinţa generală de creştere după acest timp de stimulare, o excepţie este acidul glutamic, care, în afara unor creşteri observate la muşchii menţinuţi în repaus 60 min, are un nivel scăzut în restul celorlalte trei variante.

După 30 min de stimulare, glutamina prezintă creşteri în toate cele patru variante, lizina şi acidul glutamic numai după îngheţarea imediată a muşchilor stimulaţi, iar arginina, serina şi glicocolul scad în toate variantele. După stimulări de 60 min, toţi aminoacizii prezintă scăderi ale nivelului lor, iar alanina, lizina, serina, glicocolul şi acidul glutamic scad în toate variantele.

Variaţiile cele mai evidente în sensul unor creşteri le prezintă alanina şi, mai ales, glicocolul după stimulările de 15 min. Este interesant că aceşti doi aminoacizi cresc şi în urma unui tetanos de 10 s [5]. Toate aceste variaţii fac evidentă afirmaţia că în cursul unui efort muscular de scurtă durată — şi în special de lungă durată — aminoacizii joacă un rol important în menţinerea activităţii contractile a muşchilor, participînd la procese metabolice prin care se generează energia necesară procesului de contracţie musculară.

CONCLUZII

1. În urma stimulărilor de scurtă durată, 30 s, 1 şi 3 min, cu îngheţarea imediată a muşchilor, nivelul aminoacizilor totali scade, fapt care atestă participarea lor directă încă din primele faze ale contracţiei.

2. După lăsarea în repaus timp de 30 s, 1 şi 3 min a muşchilor supuşi unor stimulări de durate egale, se constată că, stimulînd 30 s şi, în special, 1 min şi lăsînd muşchiul în repaus 1 min, se produc creşteri ale nivelului aminoacizilor totali, în timp ce stimulările de 3 min provoacă scăderi care persistă şi după toate celei trei perioade de repaus.

3. Stimulînd perioade de timp lungi, se constată creşteri ale aminoacizilor totali după 15 min, care devin mai nete prin păstrarea în repaus timp de 15 min, şi scăderi după 30 şi 60 min, care persistă şi după pauze de 15, 30 şi 60 min. Variaţiile observate dovedesc că în aceste condiţii există o dependenţă între procesele de metabolizare a aminoacizilor şi timpul de stimulare a muşchilor.

4. S-a constatat, după separarea cromatografică a aminoacizilor, că în muşchii gastrocnemieni de broască, dintre cei 15 aminoacizi identificaţi (în afară de carnozină şi glutation), cei care au concentraţiile cele mai ridicate sînt lizina, glutamina, acidul glutamic, glicocolul, serina, alanina arginina şi leucinele.

5. Cele mai evidente creşteri după stimulările de 15 min le prezintă alanina şi glicocolul, în timp ce acidul glutamic este singurul aminoacid care scade.

6. După 30 min de stimulare, singurul aminoacid care mai prezintă creşteri în toate cele patru variante studiate este glutamina, iar nivelul serinei şi al acidului scade cel mai mult.

7. Stimulările de 60 min produc scăderi ale nivelului tuturor aminoacizilor, cele mai evidente constatîndu-se în cazul lizinei şi glicocolului.

8. Concluzia generală care se desprinde din aceste experienţe este că metabolismul aminoacizilor este un factor activ în menţinerea şi potenţarea activităţii contractile a muşchilor.

Prezentat la redacţie
la 28 martie 1966

Institutul de Biochimie al Academiei Republicii Socialiste România

BIBLIOGRAFIE

1. K. Macek, I.H. Hais, J. Gasparik, J. Kopecký, V. Rábek, *Bibliography of paper chromatography* 1957—1960 *and survey of applications*, Publishings House of the Czechoslovak Academy of Sciences, Prague, 1962.
2. S.F. Velick, *The metabolism of myosin, the meromyosins, actin and tropomyosin in the rabbit*, Biochim. biophys. Acta, **20**, 228 (1956).
3. P. Arese, R. Kirsten, E. Kirstan, *Metabolitgehalte und -gleichgewichte nach tetanischer Kontraktion des Taubenbrustmuskels und des Rattenskeletmuskels*, Biochem. Z., **341**, 523 (1965).
4. C. Gerez, R. Kirsten, *Untersuchungen über Ammoniakbildung bei der Muskelarbeit*, Biochem. Z., **341**, 534 (1965).
5. U. Krieg, E. Kirsten, *Freie Aminosäuren im roten und weisen Muskel vom Kaninchen*, Biochem. Z., **341**, 543 (1965).
6. D. Tănăsescu, *Acizii lactic şi piruvic din muşchii gastrocnemieni de broască în contracţia izotonică*, St. cerc. biochim., **7**, 285 (1964).
7. D. Tănăsescu, *Variation of the lactic acid after electrical stimulation of frog gastrocnemius treated with* 1-*fluoro*-2,4-*dinitrobenzene*, Rev. roum. biochim., **2**, 379 (1965).
8. D. Tănăsescu, *Aerobic glycolysis, phosphorylase a and* b, *and aldolase during muscular contraction* Rev. roum. biochim., **2**, 269 (1965).
9. M. Camis, *Physiological and histological observations on muscles, chiefly in relation to the action of guanidine*, J. Physiol., **39**, 73 (1909).
10. C. Medeşan, *Nivelul fosfocreatinei după administrarea, respectiv imersarea, muşchilor în soluţii de fosfaţi şi creatină*, St. cerc. biochim., **7**, 375 (1964).
11. S. Moore, W.N. Stein, *A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of aminoacids and related compounds*, J. biol. Chem., **211**, 907 (1954).
12. J.M. Hais, K. Macek, *Cromatografia pe hîrtie*, Edit. tehnică, Bucureşti, 1960.
13. J.L. Bailey, *Techniques in Protein Chemistry*, Elsevier, 1962.
14. I. Smith, *Chromatographic and electrophoretic techniques*, Interscience Publishers, New York, 1962.
15. J. Barrollier, *Ein Ninhydrinreagens für quantitative Aminosaurenbestimmungen auf Papierchromatogrammen*, Nturwissenschaften, **42**, 416 (1955).
16. C.F. Cori, în *Enzymes : units of biological structure and function*, sub redacţia O.H. Geabler, Academic Press, New York, 1956, p. 573.
17. D. Tănăsescu, *Glicoliza şi reglarea sa enzimatică în cursul contracţiei musculare*, St. cerc. biochim., **9**, 207 (1966).
18. O. Meyerhof, *Die Zeitgebundenheit der Milchsäurebildung in der Muskelkontraction*, Klin. Wschr., **10**, 214 (1931).
19. E.G. Krebs, C. Gonzales, J.B. Posner, D.S. Love, G.E. Bratvold, E.H. Fischer, *CIBA Symposium on control of glycogen metabolism*, Churchill, Londra, 1964, p. 200.
20. R.K. Scopes, *Isolation and properties of a basic protein from skeletal muscle sarcoplasm*, Biochem. J., **98**, 193 (1966).
21. H. Nakasawa, R.H. Lindsay, P.P. Cohen, *Composition and labeling patterns of "Free" and protein amino acids in Rana catesbeiana tadpoles and frogs*, Arch. Biochem. Biophys., **106**, 299 (1964).
22. E. Roberts, D.G. Simonsen, *Free aminoacids in animal tissue*, în *Amino Acid Pools*, J.T. Holden, Elsevier, 1962, p. 284.
23. G.P. Briner, *The constituent of the trichloracetic acid extract of foot muscle and their relationship to "ion balance"*, Biochim. biophys. Acta, **50**, 353 (1961).

ST. CERC. BIOCHIM., 9, 4, 377–379 (1966)

VALORILE GLUTATIONULUI TOTAL, REDUS ŞI OXIDAT ÎN SÎNGELE ARTERIAL ŞI VENOS

FLORICA TOCILESCU ŞI E. GIOSAN

577.02

Rezumat. — Deplasarea echilibrului reacţiei $2\,GSH \rightleftarrows GSSG + 2H + 2^{e-}$ în funcţie de pH-ul mediului constituie cadrul lucrării de faţă, în care s-a analizat influenţa variaţiilor de pH din sîngele arterial asupra GSSG şi GSH, raportate la componenţa venoasă a glutationului.

La 18 cazuri s-au efectuat, pe sînge venos şi arterial, determinări de glutation total şi redus prin metoda Woodward şi Frey, paralel cu determinări de pH efectuate electrometric la un pH-metru Godardt cu electrod de sticlă.

Analiza valorilor medii ale pH sanguin arterial (7,41) şi venos (7,38), raportate la valorile medii pentru GSH arterial (36,18) şi venos (38,14), explică diferenţele rezultate pentru glutationul total venos — arterial prin deplasarea echilibrului reacţiei $2\,GSH \rightleftarrows GSSG + 2H + 2^{e-}$ într-un sens sau altul, în funcţie de pH-ul mediului.

Întrucît în literatură valorile medii ale glutationului total şi redus variază în limite foarte largi, ne-am propus să determinăm acest sistem redox-tiolic în sîngele arterial şi venos pentru a stabili valorile medii.

S-au studiat variaţiile GSH şi GSSG dintre sîngele arterial şi venos în funcţie de diferenţele de pH existente, considerînd că acest factor determină variaţiile mari ale limitelor fiziologice ale GSH găsite de diverşi autori (Gabbé: 29—37 mg%, Kitamura: 18—32 mg%, Varela: 40—56 mg %[4]).

MATERIAL ŞI METODA

Pe un număr de 18 cazuri s-au efectuat în sîngele arterial şi venos determinări de glutation total şi redus prin metoda Woodward şi Frey [13], paralel cu determinările de pH, efectuate electrometric la un pH-metru Godardt cu electrod de sticlă. Glutationul oxidat s-a obţinut prin diferenţa dintre cele două titrări.

Valorile obţinute pe 18 cazuri pentru glutationul total, GSH şi GSSG au fost prelucrate statistic după metoda perechilor [11].

Rezultatele valorilor medii (m), varianţa diferenţelor individuale (S^2) şi valorile p sînt redate în tabela 1.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Valorile medii obţinute pentru glutationul total arterial (44,37 mg%) comparativ cu cel venos (46,50 mg%), precum şi cele ale GSH arterial (36,18 mg%) comparativ cu cel venos (38,14 mg%), redau concentraţii

mai ridicate ale acestor două componente în sîngele venos în raport cu sîngele arterial. Valoarea medie rezultată pentru GSH venos (38,14) este apropiată limitei superioare date de Gabbé (29—37 mg/100 ml) pentru această componentă. Media glutationului total arterial (44,37 mg/100 ml)

Tabela 1

Valorile glutationului în sîngele arterial şi venos

	m	S^2	p
(GSSG + GSH) A	44,37	2,19	< 0,01
(GSSG + GSH) V	46,50		
GSH A	36,14	2,38	< 0,01
GSH_V	38,14		
$GSSG_A$	8,19	1,38	$0,6 < p < 0,5$
$GSSG_V$	8,36		

m media ; S^2 varianţa diferenţelor individuale, A = arterial ; v = venos.

şi a celui venos (46,50 mg/100 ml) se încadrează în limita superioară a limitelor fiziologice (45—45 mg/100 ml) [1].

Rezultatele medii ale GSSG arterial (8,19 mg) faţă de GSSG venos (8,36 mg) evidenţiază diferenţe mici, a căror prelucrare statistică s-a dovedit nesemnificativă. Din analiza datelor obţinute se constată că în sîngele venos concentraţia de glutation total este mai ridicată decît în sîngele arterial pe seama GSH, aportul GSSG fiind nesemnificativ.

Din datele statistice obţinute reiese că diferenţele arterio-venoase ale glutationului total şi redus sînt semnificative ($p < 0,01$) în sensul unor valori mai mari pentru componentele venoase.

Diferenţa arterio-venoasă a pH-ului sanguin*, ca şi concentraţia scăzută în O_2 a sîngelui venos faţă de cel arterial [5], [12] ar explica rezultatele obţinute.

Diferenţele arterio-venoase ale glutationului total se datoresc creşterii GSH la un pH mai scăzut în sîngele venos printr-o deplasare a echilibrului de reacţie de la forma disulfit (GSSG) la forma sulfidril (GSH), prin intermediul H^+ rezultaţi din procesele metabolice intermediare [1]. La reducere GSSG în GSH participă glutation-reductaza, cuplată cu codehidrogenaza II : $TPNH + H^+ + GSSG \rightleftarrows TPN + 2GSH$.

CONCLUZII

Sîngele venos prezintă o concentraţie mai ridicată în glutation total faţă de sîngele arterial, datorită nivelului mai ridicat în GSH.

Diferenţa semnificativ statistică obţinută pentru valoarea GSH arterial faţă de cel venos, în sensul unor valori mai ridicate ale GSH venos,

* pH-ul sîngelui arterial = 7,41 ;
pH-ul sîngelui venos = 7,38.

exprimă labilitatea echilibrului reversibil : 2 GSH $\rightleftarrows$ GSSG + 2^{e^-} + 2H.

În sîngele venos, pH-ul mai scăzut deplasează echilibrul reacţiei spre stînga, determinînd astfel o creştere a GSH venos, în timp ce pentru sîngele arterial are loc o scădere a GSH datorită pH-ului mai crescut.

Prezentat la redacţie
la 8 martie 1966

Institutul de expertize şi recuperare a capacităţii de muncă, Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. Bona E., Z. ges. inn. Med., **12**, *6*, 282 (1957).
2. Hennemann G., Hofmann, B., Ärztl. Wschr., **12**, *37*, 822 (1957).
3. Hennemann G., Hofmann B., Ärztl. Wschr., **12**, *38*, 846 (1957).
4. * * * *Held at Ridgefield Glutathion A. Symposium*, New York, Connecticut Academic Press, Inc. Publishers, 1954.
5. Knick B., Sadel R., Ärztl. Forsch. **1**, **34** (1956).
6. Müsebeck K., Gabsch Chr. H., Z.ärztl. Fortbild., **50**, *22*, 923 (1956).
7. Otto H., Z. ges. inn. Med., **12**, *19*, 892 (1957).
8. Parhon C.C., Popescu I., Ilioasa E., Fiziol. norm., patol. **4**, *2*, 123 (1957).
9. Roşca D. et al., Comunic. Acad. R.P.R., **11**, *3*, 325 (1961).
10. Ritter S., Rausch L., Ärztl. Forsch., **12**, 533 (1954).
11. Sluşanschi H., St. cerc. biochim., **8**, *2*, 234 (1965).
12. Soru E., *Biochimie medicală*, ed. a II-a, Bucureşti, Edit. medicală, 1959.
13. Woodward G.E., Frey E.G., J. biol. Chem., **97**, 465 (1932).

ST. CERC. BIOCHIM., 9, 4, 381–390 (1966)

REFERAT GENERAL

STRUCTURA ŞI FUNCŢIA LA NIVELUL BIOCHIMIC DE ORGANIZARE A MATERIEI VII

H. USCHERSOHN

577.1

Existenţa unui nivel structural mai profund decît cel celular, care să explice unele manifestări biologice cu cauze încă necunoscute, a fost presupusă încă din secolul trecut. Avem în vedere în primul rînd problema — mult discutată în medicină — a tulburărilor funcţionale „pure", neînsoţite de modificări morfologice.

Încă din secolul trecut, medicii au înţeles că la baza unor astfel de tulburări stau modificări morfologice încă imperceptibile pentru mijloacele noastre de observaţie (I. V. Pavlov, V. Babeş). În secolul al XX-lea, mijloacele moderne de cercetare — optice şi chimice — impun concluzia unor leziuni moleculare (biochimice) la baza acestor tulburări. Vechea „patologie funcţională" apare ca o „patologie moleculară" (L.v. Pauling). Ştiinţa medicală consideră azi că mulţi agenţi patogeni încep să acţioneze producînd iniţial doar modificări metabolice infrastructurale „invizibile", care treptat încep să se manifeste „vizibil", întîi microscopic şi apoi macroscopic (C. I. Parhon, citat după [7 a]). În aşa-zisa patologie chimică s-au găsit modificări în topografia enzimelor celulare, lipsa sau inversarea poziţiei unor aminoacizi din proteinele de bază etc. Neurologia contemporană foloseşte enzimo-diagnosticul, care permite decelarea unor tulburări structurale precoce, uneori doar cantitative, alteori şi calitative, deseori încă în faza lor reversibilă. Cînd microreacţiile repetate sînt reduse ca limite şi reversibile, ele nu duc la modificări structurale „vizibile" [20].

Dar existenţa unui nivel morfo-funcţional infracelular (molecular) a mai fost postulată şi în discuţia problemei teoretice, nerezolvată de fiziologia clasică, a *mecanismului cauzal al funcţiei.*

Funcţia biologică depinde, atît de o cauză internă (automişcarea biologică, avînd la bază autoreînnoirea permanentă a structurii, turnoverul celular în limbajul biologiei moleculare), cît şi de o cauză externă (mediul) care acţionează prin intermediul cauzei interne, al procesului de metabolism. Dar în studiul cauzei, materialismul dialectic face o distincţie între *agentul cauzal* ca atare şi *mecanismul său de acţiune*, modul în care acesta determină efectul (distincţie reflectată în medicină în deosebirea dintre etiologia şi patogenia bolilor).

Or, mecanismul cauzal prin care mediul extern determină funcţia biologică e de *ordin fizico-chimic.* Procesele biologice, care încep cu transformările suferite de materia fără viaţă în interiorul organismului (asimilaţie) şi care se termină prin transformarea materiei vii în materie fără viaţă (dezasimilaţie, excreţie), sau cele care au loc între receptorii nervoşi şi excitanţii fizico-chimici au la bază procese fizico-chimice. Mecanismul intim fizico-chimic al oricărui proces biologic explică în ultimă instanţă modul în care factorii externi determină (declanşează) funcţia, precum şi modul în care funcţia determină, la rîndul ei, structura organis-

mului viu. De aceea, sublinia just prof. Tg. Riga, nici experimentul, folosit azi larg pentru modificarea morfogenezei, nu lămureşte pe deplin procesul de adaptare a formei la funcţie, în sensul că, deşi îi descoperă cauza, nu permite dezvăluirea mecanismului intim [7 *b*].

1. Ce este *nivelul infrastructural* de organizare a materiei vii?

În ştiinţa contemporană s-a impus teoria nivelurilor de organizare a materiei, caracterizate prin legi şi trăsături specifice, ca şi prin subordonarea nivelurilor inferioare faţă de cele superioare în care sînt incluse. Se consideră că universul *cunoscut* azi ar fi cuprins în 41 dex zecimali, de la 10^{-13} la 10^{28} (Allen, citat de [26]). Această teorie s-a impus în ultimele decenii şi în domeniul biologiei, care ar cuprinde 10 dex (J. B. Haldane, citat de [26]). Există diferite sisteme de clasificare a acestor niveluri, începînd de la cele infracelulare pînă la biocenoză [5]. E de remarcat că majoritatea acestor sisteme sînt pur dimensionale (Fry Wyssling 1955, J. D. Bernal 1959) [2] şi puţine se referă şi la particularităţile lor funcţionale sau legice.

În legătură cu problema noastră am vrea să subliniem : *1*) lipsa de unitate în denumirea şi interpretarea nivelurilor infracelulare (se folosesc termenii de nivel molecular, macromolecular, intermolecular, supramolecular, deşi unora dintre aceşti termeni li se acordă de alţi autori alte sensuri) şi *2*) lipsa frecventă a precizării nivelului de la care se poate vorbi de viaţă (nivelul de la care *încep să se manifeste legile biologice* şi sub care se află domeniul propru-zis al chimiei şi fizicii). Simpla descriere a scării dimensionale a nivelurilor, fără precizarea acestei limite, nu poate interesa prea mult pe biologi.

Totuşi, mulţi biologi încadrează nivelul structurii submicroscopice în domeniul vieţii, considerîndu-l *nivelul cel mai de jos*. Această idee e susţinută şi în unele lucrări relativ recent apărute în ţara noastră (I. Cotăescu, V. Săhleanu, B. Stugren).

Scopul articolului nostru este să evidenţieze *natura biologică* a acestui nivel şi să analizeze, în această lumină, raportul specific dintre *structură* şi *funcţie*.

Nivelul infrastructural, submicroscopic, macromolecular [1]) (al biopolimerilor) sau supramolecular [2], intermolecular, numit şi leptonic [3], e obiectul de studiu al biologiei moleculare, biochimiei şi biofizicii, ştiinţe care studiază azi mecanismele moleculare şi electronice ale funcţiilor vitale (acte elementare), pe care fiziologia secolului al XIX-lea le abordase mai mult descriptiv, neizbutind să ajungă la mecanismele lor intime.

Importanţa acestui nivel constă în faptul că permite aprofundarea studiului teoretic al vieţii la un nivel mai adînc decît cel celular, ca expresie a unei laturi mai profunde a esenţei vieţii (18 *a*). E demnă de relevat legătura acestui nivel cu problema *definiţiei vieţii*, explicată prin faptul că la acest nivel se află *purtătorul material al vieţii*. În concepţia lui Engels, definiţia vieţii, ca şi a oricărei alte forme de mişcare a materiei, e legată de un purtător material specific, pe care Engels l-a identificat cu proteina. Majoritatea biologilor contemporani consideră că viaţa trebuie legată nu numai de proteine, ci şi de acizii nucleici, ca substanţe fundamentale. Or, atît proteinele, cît şi acizii nucleici sînt elemente constitutive ale nivelului macromolecular de organizare a materiei vii. Legătura acestui nivel cu o latură atît de importantă a esenţei vieţii îi conferă o valoare care merită a face obiectul unor cercetări teoretice mai profunde.

Molecula şi atomul — ca atare — sînt purtătorii materiali ai formelor de mişcare fizică şi chimică. În măsura în care ele intră într-un *nou tip de interacţiune* (biologică), constituind complexe de macromolecule (biopolimeri), aceştia reprezintă purtătorul material al mişcării biologice, fiind supuşi astfel legilor biologice. Viaţa nu e posibilă în afara structurii macromoleculare şi a stării coloidale. Nivelul biopolimerilor reprezintă un nivel intermediar între

---

1 Considerăm corect termenul de nivel macromolecular, şi nu molecular, deoarece ultimul e un nivel chimic. Nivelul macromolecular nu poate fi redus la mcromolecula proteică, deoarece aceasta e *doar una* din constituentele lui.

2 B. Stugren deosebeşte nivelul macromolecular de cel supramolecular, care ar fi propriu organitelor celulare [28, p. 29]. Majoritatea autorilor nu fac această distincţie.

3 După Davîdovschi, nivelul leptonic e nivelul grupelor funcţionale ale proteinelor.

nivelul organitelor celulare şi nivelul molecular (chimic), constituind astfel *domeniul de graniţă nemijlocită* între biologie şi chimie. Stînd la baza tuturor proceselor biologice, el reprezintă *primul nivel morfo-biologic* [1], nivelul morfologiei supramoleculare (morfologia macro- şi microscopică constituind, după Alpatov, morfologia doar în *sens restrîns* [4]). De aceea, scrie Wintrebert, „forma este expresia tardivă a unei structuri chimice determinate" [3].

Ca nivel biologic, acest nivel are *proprietăţi biologice*; azi se subliniază *adaptabilitatea* sa, participarea sa la *selecţia naturală* [18 *b*], precum şi *funcţia de reglaj*. Din acest punct de vedere, Hailov deosebeşte structurile fiziologice-biochimice, care asigură reacţiile homeostatice locale, de structurile morfologice propriu-zise, care nu asigură homeostazia şi apar doar ca factor de optimizare a funcţiilor interne [13]. Funcţia de reglare e legată, la rîndul ei, de cea de *purtător şi transmiţător al informaţiei biologice*. Zbarschi consideră că la definiţia vieţii dată de Engels, în care se subliniază rolul procesului de metabolism, mai trebuie adăugată şi informaţia biologică [31 *a*].

Deşi nivelul macromolecular face parte din nivelurile structurale biologice, considerăm îndreptăţită părerea unor biologi sau biochimişti care susţin că acest nivel trebuie definit ca *biochimic* prin specificul său, deoarece atît structura, cît şi funcţia suferă o *dublă influenţă* a celor două domenii învecinate — biologic şi chimic. Sisakian vorbeşte chiar despre *legi biochimice*, calitativ noi, mult mai complexe decît obişnuitele legi chimice [27 *a*]. Credem totuşi că noţiunea de „lege biochimică", ca ceva intermediar între legea chimică şi cea biologică, mai trebuie precizată.

Nivelul macromolecular nu poate fi înţeles decît subordonat nivelurilor superioare şi — în ultimă instanţă — organismului integral, mono- sau pluricelular, a cărui influenţă integratoare o suportă. Dar şi el, la rîndul lui, constituie un principiu explicativ al nivelurilor supraordonate. Astfel, celula e expresia unui echilibru între forţele şi procesele fizico-chimice, care se desfăşoară la nivel leptonic. Gauze şi Alpatov au demonstrat parţial că inversiunea (disimetria) morfologică are la bază o inversiune moleculară [1], cu predominanţa unor izomeri optici de forma „l" sau „d". Este evident că legătura dintre niveluri se realizează doar prin intermediul funcţiilor.

Dat fiind că nivelul macromolecular constituie graniţa dintre biologic şi chimic şi că noţiunile de structură şi de funcţie sînt folosite şi în chimie (alcooli, fenoli, tioli, acizi, baze etc.), e necesar să definim cu precizie semnificaţia *structurii* şi *funcţiei biologice* la acest nivel [17], [19], [22], precum şi specificul lor faţă de nivelurile biologice supraordonate.

2. *Structura* macromoleculară a materiei vii e legată de compoziţia sa chimică. Nivelul macromolecular *nu poate fi caracterizat printr-o unitate biochimică de bază*, datorită eterogenităţii elementelor care stau la baza vieţii (proteine, acizi nucleici, nucleoproteine, lipide, polizaharide etc.). Structura macromoleculară e caracteristică tuturor acestor elemente, aşa cum se găsesc ele întrepătrunse în structura morfologică a protoplasmei şi nucleului celular. Dar între aceste elemente, rolul principal îl joacă proteinele şi acizii nucleici. Toate funcţiile biologice sînt în esenţă funcţii ale proteinelor, acestea joacă rolul principal în orice proces biologic, înalta lor diferenţiere structurală explicînd excesiva lor specializare (în special enzimele şi anticorpii). Este evident că şi celelalte substanţe — şi în mod special acizii nucleici, dar şi lipidele şi hidrocarbonaţii — joacă un rol esenţial, fără ca aceasta să diminueze importanţa proteinelor în procesul de metabolism [27 *b*]. Gulii consideră că apariţia şi funcţiile acestor substanţe sînt rezultatul funcţiilor proteinelor [12 *b*].

Structura macromoleculei proteice nu e doar chimică, ea e *şi biologică*. Materia vie se reconstruieşte în permanenţă prin asimilarea materiei fără viaţă, care, pătrunzînd în orga-

---

4 Nu toţi autorii sînt de acord în această interpretare. I. V. Davidovschi şi alţi patologi refuză să recunoască schimbările la nivel leptonic drept modificări morfologice [20].

nism, se organizează în materie vie, căpătînd funcţii biologice şi o structură corespunzătoare. Ordinea, secvenţa aranjării aminoacizilor în lanţurile peptidice nu poate fi explicată prin legităţi fizico-chimice, ci doar prin legităţi biologice. Enzimele, hormonii, vitaminele etc. nu există în stare naturală în materia fără viaţă ; ele reprezintă structuri chimice sintetizate filogenetic în materia vie şi specifice acesteia. M. Florkin numeşte moleculele „organi", iar cenapsele cu funcţii specializate bine definite în organismul viu „substanţe funcţionale", ele fiind „veritabile organe la scară moleculară", fabricate de organism [9 *a*]. Activitatea unei substanţe funcţionale, spune Florkin, depinde de structura specială în care sînt ordonaţi constituenţii, *inactivi prin ei înşişi* [9 *b*]. Totuşi, arată el, această arhitectură este — *cel puţin în parte* — condiţionată de proprietăţile *chimice* ale acestor substanţe [9 *c*]. Oparin arată că studiul proprietăţilor chimice ale polipeptidelor sintetice demonstrează că funcţiile chimice ale aşa-numiţilor radicali (R) suferă modificări importante în urma includerii lor în lanţul peptidic, depinzînd şi de ordinea aminoacizilor în acest lanţ [25 *a*]. Toate structurile elementelor vii, inclusiv cele de la nivelul leptonic, poartă, deşi într-o măsură diferită, pecetea apartenenţei lor la sistemul integral al organismului viu. Orice parte componentă a întregului biologic suferă inevitabil influenţa transformatoare a sistemului integral şi nu e identică cu ea însăşi în afara limitelor sistemului [16].

Macromolecula proteică, ca structură biologică fundamentală, reprezintă, în raport cu structura chimică propriu-zisă, o creştere a negentropiei (Schrödinger) şi a informaţiei. Se poate demonstra că cantitatea de informaţie (*bits*) a unui sistem e proporţională cu negentropia sa, exprimată în calorii/mol [4]. Scăderea entropiei e strîns legată de diferenţierea tot mai pronunţată a structurilor şi implicit de specializarea tot mai mare a funcţiilor.

Specificitatea biologică a structurii biochimice are manifestări diferite, de la particularităţile de specie pînă la cele generale ale chimismului vieţii [17 *a*]. Dependenţa proteinelor şi a acizilor nucleici de specie, ţesut, organ, chiar individ, vîrstă etc., e specific biologică. Pe de altă parte, există o adaptare — specific biologică — a structurii biochimice la funcţie prin includerea acestor structuri în lanţul unor reacţii riguros determinate în cadrul metabolismului (valoarea biologică nu apare într-o reacţie chimică izolată, ci doar în şirul lor succesiv şi în rezultatul global al unui ciclu, a cărui desfăşurare e supusă acţiunii legilor biologice şi nu celor chimice). Pentru a sublinia importanţa coordonatei temporale în înţelegerea structurii biochimice, acad. E. Macovschi vorbeşte despre *structura cvadridimensională* a materiei vii [21] ca o expresie a modului specific de manifestare a unităţii dialectice dintre materie-mişcare-spaţiu şi timp la nivelul structurilor biologice fundamentale.

Funcţia biologică a unei proteine nu poate fi explicată prin simpla cunoaştere a compoziţiei ei chimice, în afara structurii spaţiale, tridimensionale. Capacitatea de reacţie a proteinelor e determinată atît de alternanţa aminoacizilor în lanţul polipeptidic, cît şi de legăturile dintre radicalii lanţurilor alăturate. Biochimia diferenţiază azi patru tipuri de structuri în cadrul complexelor de biopolimeri (de unde şi posibilitatea diferenţierii informaţiilor cuprinse în fiecare din ele). Complexitatea de structură creşte cu greutatea moleculară (respectiv cu numărul de aminoacizi) de care depinde numărul izomerilor (un lanţ de 20 de aminoacizi dă $2{,}4 \times 10^{18}$ combinaţii posibile). Aşa se explică cum doar cu 20 de acizi aminaţi se creează diversitatea inepuizabilă a structurilor proteice în raport cu specia, ţesutul, individul, vîrsta etc.

3. *Funcţiile* biopolimerilor — specifice diferitelor structuri (enzime, hormoni, vitamine, antigene, anticorpi) şi chiar structurilor diferite ale fiecăreia din ele — sînt *biologice* prin natura lor : plastice (participă la formarea structurilor indispensabile vieţii), catalitice-fermentative (asigură desfăşurarea biologic ordonată a metabolismului), hormonale, toxice, imunologice etc. Aceste funcţii sînt însă şi *biochimice* în măsura în care implică modificări moleculare şi *biofizice*, în măsura în care e vorba de mecanisme energodinamice.

Ca o expresie a caracterului lor biologic, procesele biochimice metabolice, în care găsim multe reacţii relativ simple, reversibile (explicate în majoritate printr-un mecanism de *feed-*

back), cuprind deseori şi o transformare ireversibilă, în conformitate cu ordonarea într-o direcţie dată a metabolismului în ansamblul său. În biologia moleculară se deosebesc azi simplele *inducţii enzimatice*, care reprezintă, în special la bacterii, procese reversibile, de *inducţiile proprii proceselor de diferenţiere celulară*, care sînt considerate în general — nu totdeauna (Jacob şi Monod, citat după [15]) —procese ireversibile [10]. De asemenea, proprietăţile biochimice ale diferitelor structuri depind totdeauna şi de starea fiziologică a organismului integral. Biochimia arată că manifestarea celei mai elementare funcţii nu e determinată de acţiunea unei singure substanţe, ci de a unui sistem de catalizatori şi de structuri în interdependenţă [27 *c*]. În zilele noastre se elaborează morfologia biochimică a celulei.

Dacă funcţiile hormonilor şi ale vitaminelor au un profil biologic mai conturat, manifestările funcţionale ale enzimelor depind de natura chimică a substratului (care e şi criteriul clasificării lor în hidrolaze şi desmolaze), pe care îşi exercită acţiunea. La animale există o corelaţie indisolubilă între natura alimentelor şi natura enzimelor (omnivorele digeră în egală măsură proteine, glucide, grăsimi ; erbivorele sînt, în majoritate, deficitare în proteaze, iar carnivorele în glucidaze). Cu toate acestea, funcţiile enzimelor *nu sînt pur chimice, ci biochimice*, deoarece ele constituie mecanismele specifice prin care se realizează orice proces fiziologic celular (în primul rînd metabolismul şi sinteza proteinelor), structura şi funcţia lor fiind determinate de acţiunea legilor biologice (acţiunea lor *in vitro*, în lipsa substratului specific şi a ambianţei normale, e deosebită de aceea *în vivo*). Prin intermediul enzimelor, procesele biochimice sînt dirijate pe căi riguros determinate, asigurîndu-se astfel orientarea generală a procesului funcţional respectiv.

4. *Originea filogenetică* (selecţia naturală). Structura şi funcţia macromoleculei biologice nu pot fi înţelese, de altfel ca nici o altă structură şi funcţie biologică actuală (şi tocmai aceasta este un alt argument important al naturii lor biologice comune), în afara *dezvoltării filogenetice* a întregii materii vii. Pe această bază s-a dezvoltat în ultimele decenii biochimia evoluţionistă, care studiază tocmai bazele (argumentele) biochimice ale evoluţiei lumii organice.

Pe măsura organizării tot mai perfecte a sistemelor vii, în procesul evoluţiei orientate — spune Oparin — apăreau căi tot mai bătătorite folosite constant de procesele biochimice, se forma o reţea tot mai perfectă de reacţii metabolice, care a ajuns azi la un înalt grad de organizare [25 *b*]. Numai ca rezultat al selecţiei naturale s-a putut ajunge la acea finalitate excepţională a structurii enzimelor, acea concordanţă perfectă între structură şi funcţia lor. Această concordanţă perfectă nu a putut apărea întîmplător şi nici în virtutea legilor fizico-chimice ; ea a implicat acţiunea unor legi noi, specifice vieţii.

Toate substanţele proteice sînt formate din aproximativ 20 de acizi aminaţi, selecţionaţi prin selecţie naturală din mulţimea de acizi aminaţi existenţi. Din punct de vedere chimic, organismul viu — animal sau vegetal — nu cuprinde toate elementele chimice, el fiind compus dintr-un număr relativ redus de metale şi nemetale, iar principalele elemente chimice sînt constituite din atomi uşori aparţinînd primelor 4 perioade ale sistemului lui Mendeleev [9 *d*], tot ca rezultat al selecţiei naturale. În evoluţia biologică asistăm la o tendinţă de *simplificare chimică* (omul are nevoie doar de 11 aminoacizi) şi de *complicare morfologică* (R. S. Eakin, citat după [31 *b*]). În filogenie, sub acţiunea selecţiei naturale s-au constituit unele formaţii structurale stabile, universale pentru mari grupe de procese biochimice, fiind legate de funcţii fundamentale. Repetabilitatea stabilă a diferitelor structuri moleculare şi a funcţiilor lor este expresia legăturii necesare dintre structură şi funcţia biologică. Organizarea fundamentală comună şi mecanismele comune (unor nivele foarte diferite de organizare a materiei vii, de la virusuri la animale superioare) de realizare a proceselor fundamentale ale vieţii exprimă în ultimă instanţă un aspect specific al unităţii lumii vii.

În dezvoltarea filogenetică a materiei vii, noile structuri biochimice, care apar sub influenţa unor noi condiţii de mediu, se clădesc deasupra structurilor fundamentale anterioare, ca un fel de *suprastructură* ; structurile vechi nu dispar (altfel nu s-ar putea explica continuitatea

şi nici progresul dezvoltării), ci *se complică*, ceea ce se realizează prin intermediul unei *codificări* [29].

5. *Variabilitate şi stabilitate în ontogeneză.* Deşi apărute filogenetic, structura şi funcţia macromoleculei proteice nu sînt moştenite gata formate, ci se constituie şi se dezvoltă în ontogeneză sub influenţa şi controlul permanent al condiţiilor de mediu.

La nivelul macromoleculei biologice, nu numai funcţia, ci şi structura se află într-o continuă *schimbare*, expresie a adaptării la cele mai mici variaţii ale ambianţei. Astfel se observă modificări în structura microscopică a condriozomilor în raport cu fazele funcţionale. Compoziţia chimică a nucleului (şi în special a ADN) e supusă la mari variaţii în timpul fazelor funcţionale ale celulei (cantitatea de ADN din nucleul celulei glandulare scade pe măsura elaborării şi acumulării în citoplasmă a produsului specific, printr-un mecanism de *feed-back*).

Dar această variabilitate e limitată de *stabilitatea* caracteristică a structurii. Stabilitatea structurilor biochimice fundamentale, cîştigată şi întărită prin selecţie naturală, bazată în primul rînd pe *stabilitatea moleculei de ADN*, a constituit o condiţie esenţială a progresului biologic, deoarece a permis lumii organice să nu trebuiască să o ia mereu de la capăt, ci să se dezvolte pe linia unei perfecţionări continue. Această stabilitate e însă prin excelenţă *dinamică*, datorită includerii ei în procesul de metabolism. Karpinskaia face o distincţie între stabilitatea *elementelor* constitutive ale structurii (conservatoare prin natura lor: există numai 20 de acizi aminaţi şi 4 tipuri de nucleotide) şi cea a *structurii integrale*, care se realizează numai datorită unui proces de autoreglaj [17 *b*]. Uneori, stabilitatea e asigurată nu prin întreaga structură, ci doar printr-o parte a ei (parte activă), care răspunde direct de conservarea structurii (şi a funcţiei respective) în ansamblu (stabilitate „preferenţială", de mare însemnătate în procesul adaptării la mediu).

Funcţia biochimică e prin excelenţă *variabilă* (la nivelul macromoleculei proteice, fiziologii vorbesc de un adevărat „vîrtej metabolic"). Funcţia macromoleculei, deşi direct legată de structura corespunzătoare, depinde într-o foarte mare măsură de starea mediului, de întregul ansamblu al condiţiilor fizico-chimice ambiante. De fapt, nu există vreun factor fizico-chimic care să nu influenţeze într-un fel sau altul desfăşurarea reacţiilor enzimatice (temperatură, pH, potenţial oxido-reductor, presiune osmotică etc.).

Karpinskaia consideră că la nivelul macromolecular împărţirea în funcţii biologice şi fizico-chimice, deşi foarte relativă, există sub forma unor deosebiri reale, obiective, evidenţiate prin metode specifice de cercetare [17 *c*]. Subliniind importanţa *legăturilor* dintre proprietăţile fizico-chimice şi cele biologice la acest nivel, autoarea arată că una din sarcinile importante ale biologiei moleculare e tocmai dezvăluirea acestor relaţii. Astfel, din scăderea vîscozităţii ADN se deduce scăderea capacităţii de infectare a fagului respectiv.

6. *Unitatea dintre structură şi funcţie* e mult mai strînsă la nivelul macromolecular al materiei vii decît la celelalte niveluri. La acest nivel, orice modificare a funcţiei e legată de o modificare a structurii, nefiind în general posibilă o modificare izolată a uneia sau alteia. Datorită acestei legături indisolubile, forma — zice L. Frühling — nu e „decît funcţia văzută sub unele aspecte", iar „imaginea electronică ne permite să vedem funcţia" [11 *a*], evident că prin intermediul formei. În momentul în care modificăm forma (structura) macromoleculei (prin radiaţii sau substanţe chimice), se schimbă şi funcţia corespunzătoare. Modificarea artificială a structurii acizilor nucleici, care poate merge azi pînă la precizia înlocuirii diferitelor nucleotide, duce la modificări funcţionale la nivelul microorganismului integral. Orice intervenţie asupra structurii enzimei (deplasarea sau blocarea unei grupări chimice) reduce brusc activitatea catalitică. Toate acestea vădesc *unitatea perfectă dintre structură şi funcţie*, caracteristică întregii materii vii, la toate nivelurile de organizare.

7. Cu toate acestea există şi la nivelul macromolecular, ca şi la toate celelalte niveluri ale materiei vii, o *independenţă relativă a funcţiei faţă de structură.*

Într-o anumită măsură, această independenţă relativă e exprimată de existenţa unor substanţe asemănătoare ca structură, dar care îndeplinesc funcţii deosebite (de exemplu, antimetaboliţii care sînt diferiţi de metaboliţii naturali numai printr-o grupare chimică, dar au o funcţie opusă acestora). În procesele reglatoare ale metabolismului, inhibarea unei funcţii se realizează pe seama acţiunii unor substanţe care, prin structura lor, sînt extrem de apropiate de substanţele care asigură reacţia normală. Deosebirile în activitatea catalitică a unor structuri asemănătoare se explică foarte probabil prin structurile stereo-chimice specifice. Uneori, deosebirile de structură sînt atît de fine, încît scapă analizei directe, dar ele pot fi totuşi puse în evidenţă prin utilizarea proprietăţilor lor imunologice (inocularea lor dă naştere unor anticorpi specifici [3]).

Pe de altă parte, proteine care îndeplinesc aceeaşi funcţie se pot deosebi din punct de vedere chimic (de exemplu, insulina la porc şi taur, diferite enzime etc.). Datele cercetărilor explică această contradicţie între structuri şi funcţie la nivelul macromoleculei biologice prin *semnificaţia funcţională inegală a diverselor porţiuni ale structurii.* Proprietăţile catalitice specifice — scrie Oparin — nu sînt legate de întreaga moleculă a unei proteine [25 *c*]. Aceasta are *părţi active* (uneori foarte mici în raport cu întreaga macromoleculă), alături de altele *total indiferente* şi uşor de înlocuit sau chiar de îndepărtat, fără a afecta proprietăţile enzimatice (enzima vegetală papaina îşi conservă activitatea catalitică chiar cînd se înlătură 120 de resturi de aminoacizi din cei 180 existenţi). Aşa se explică posibilitatea schimbărilor de compoziţie ale unor proteine care reacţionează cu o sensibilitate excepţională la cele mai mici modificări fizico-chimice ale ambianţei, fără ca funcţiile lor să se schimbe.

Contradicţia dintre structură şi funcţie ajunge la extrem în cazurile de anabioză la insecte, spori, seminţe, virusuri, bacteriofagi etc. Forma biologică în stare de anabioză, deşi ruptă de funcţie, rămîne formă biologică pentru că cuprinde în ea, în stare latentă, *informaţia genetică*, astfel încît la restabilirea organismului în condiţiile de mediu necesare el îşi va putea relua manifestarea însuşirilor biologice fundamentale.

8. *Rolul conducător al funcţiei*, ca principiu fundamental al teoriei evoluţioniste în biologie, este demonstrat la nivelul macromoleculei proteice de modul *apariţiei enzimelor adaptative* (ca şi al anticorpilor), ca rezultat al unei sinteze induse. Adăugarea de lactoză la o cultură de colibacili determină formarea adaptativă a enzimei β-galactozidaza, care descompune lactoza în galactoză şi glucoză. Cu dispariţia substratului, dispare şi enzima corespunzătoare, ca expresie a unei adaptări perfecte. Jacob şi Monod au arătat că acest fenomen e datorit unei enzime noi, sinteză însoţită de formarea unei mari cantităţi de ARN. Se poate presupune — scrie Gulii — că formarea unui nou ferment adaptativ se face prin interacţiunea dintre noua substanţă ajunsă în organism şi substanţa care manifestă faţă de ea o afinitate chimică [12 *a*]. Or, cele mai reactive substanţe din organism sînt proteinele şi acizii nucleici şi în special complexele nucleoproteice (care au o deosebită reactivitate ca substanţe în care, în general, proteinele şi acizii-nucleici sînt în stare de constituire, de sinteză enzimatică). În acest proces se modifică atît substanţa proteică (care capătă proprietăţi enzimatice necesare degradării chimice a unor noi substanţe pătrunse în organism), cît şi acizii nucleici. Gulii consideră că apariţia noii proteine-enzime şi a noului acid nucleic *nu e cauza, ci efectul* schimbărilor produse în metabolism sub influenţa mediului şi e îndreptată spre asimilarea acestuia [12].

Genetica biochimică a acumulat în ultima vreme suficiente date care ne permit să considerăm că sinteza indusă a noii enzime nu se realizează sub acţiunea nemijlocită a noii substanţe introduse în organism, ci mediat prin intermediul operonilor şi al cistronilor din lanţul ADN şi ARN-mesager eliberat în citoplasmă (Jacob şi Monod). Se presupune că ARN joacă rolul de organizator celular, realizînd recepţionarea informaţiei de la ADN, precum şi canalizarea proceselor de sinteză proteică în vederea formării enzimei specifice [14]. Elementul nou introdus în celulă exercită un dublu rol : *a*) de factor inductor al modificărilor structural-

metabolice şi *b*) de iniţiator al eliminării prin selecţie a elementelor neadaptabile (Mesrobeanu şi Păunescu [23]).

Apariţia enzimelor adaptative demonstrează un fapt remarcabil : la nivelul macromolecular, *apariţia unei noi structuri coincide cu aceea a funcţiei sale biochimice*. La acest nivel, datorită naturii chimice a elementelor structurale de bază, *nu se constată precesiunea în timp a funcţiei faţă de structură*, caracteristică esenţială a nivelurilor biologice supraordonate.

Vedem astfel cum *funcţia* fiziologică celulară e legată simultan de două structuri — una *biologică propriu-zisă* (celula) şi alta *biochimică* (biopolimerii). În procesul adaptării la mediu, modificările funcţionale încep prin modificări la nivelul biopolimerilor pe baza cărora urmează modificarea *funcţiei biologice propriu-zise*, care la rîndul ei poate determina apoi modificarea *formei* biologice propriu-zise.

E foarte important să nu confundăm aceste niveluri diferite ale formelor (structurilor) *biologică propriu-zisă* şi *biochimică*, deoarece ele au relaţii diferite cu funcţia celulară. Kuprianov combate punctul de vedere al lui Petlenko, după care orice schimbare funcţională duce la modificări structurale, susţinînd, dimpotrivă, că nu orice schimbare funcţională e legată inevitabil de schimbarea formei [20]. Or, e evident că fiecare din cei doi autori se referă la un alt nivel al structurii, şi de aici aparenta contradicţie dintre părerile lor.

Succesele biologiei moleculare au permis elaborarea unor ipoteze asupra mecanismului prin care funcţia biologică determină structura organului sau prin care aceasta din urmă se adaptează la o suprasolicitare funcţională [22].

9. *Rolul activ al structurii (formei)*. Structura macromoleculei îndeplineşte, ca orice structură biologică, un rol activ; ea constituie factorul care condiţionează întregul ansamblu al proceselor metabolice şi în special *autoreglarea* (automatismul vitezelor şi concordanţa diferitelor reacţii, procese) şi autoacomodarea, extrem de elastică faţă de regimul optim de funcţionare. Biologia moleculară cunoaşte azi două mecanisme de reglare genetică a sintezei proteinelor : a) prin *control genetic* al sintezei enzimelor şi prin b) *retroinhibiţie* (inhibiţie prin *feed-back*-Novick, 1955 — prin produsul final care, acumulîndu-se, inhibă activitatea enzimei) [24].

În procesele de autoreglare joacă un rol esenţial *topografia elementelor active* (în special a enzimelor în mitocondrii şi în reţelele structurii protoplasmatice) şi în mod deosebit aceea a acizilor nucleici. În acest sens, structura acţionează ca un factor activ care determină viteza, direcţia, orientarea lanţurilor de reacţii şi legătura dintre ele. Azi e evident rolul activ al structurii asimetrice a protoplasmei în desfăşurarea proceselor metabolice ; asimetria protoplasmei constituie baza stabilităţii proceselor metabolice, asigurînd succesiunea reacţiilor metabolice într-un sens determinat [30]. Substanţele funcţionale, spune M. Florkin, existînd în cantităţi mici, ca substanţe active, sînt agenţii generatori, determinanţi ai formei biologice, agenţii executanţi ai funcţiilor şi agenţi de integrare a funcţiilor în constelaţia organică a nivelului respectiv de organizare a materiei vii [9 *a*].

Autoreglarea infrastructurilor e un proces permanent, care se realizează chiar în absenţa unor intervenţii exterioare (aport de substanţă sau energie), pentru că materia vie e în continuă restructurare ; există un permanent echilibru între morfoliză şi morfogeneză la toate nivelurile (evidenţiabil la nivel macromolecular prin circulaţia radioizotopilor încorporaţi).

Dar mecanismele celulare ale autoreglării joacă un rol fundamental doar la organismele unicelulare, deoarece la cele superioare, deşi mecanismele celulare se păstrează, rolul hotărîtor îl joacă mecanismele complexe ale reglării neurohormonale.

10. Importantele succese ale biologiei moleculare au născut convingerea că soluţia problemelor fundamentale ale biologiei trebuie căutată la nivelul infrastructurii biochimice [5]. Unii biofizicieni şi biochimişti cred că legile fizicii (inclusiv cele ale mecanicii cuantice şi cele ale chimiei) sînt în principiu suficiente pentru a înţelege esenţa proceselor biologice la nivel

[5] E. Chargaff ironizează, într-o lucrare recentă, exagerările unor biochimişti cu privire la rolul ADN în fiziologie şi genetică (vezi *Amphisbaena*, capitolul XI al cărţii sale) [6].

atomomolecular, căci în afara acestor legi nu s-ar constata acțiunea altor legi la acest nivel. În realitate, *viața nu se reduce la nici unul din nivelurile ei de organizare*, esența ei unitară nu poate fi diferită la diferite niveluri. Nu există moleculă vie, ci doar organisme vii. Pe de altă parte, unele trăsături importante ale vieții trebuie cercetate la nivelurile mai înalte de organizare, care explică comportarea individului biologic complex în mediu. Procesele atomomoleculare explică doar mecanismul intim al proceselor fiziologice celulare ; ele singure nu pot explica succesiunea în timp, atît ontogenetică, cît și cea filogenetică, a proceselor biologice, trăsătură esențială și caracteristică a mișcării biologice.

Raportul de la superior la inferior este un raport dialectic. Așa cum de pe pozițiile superiorului noi putem înțelege mai bine inferiorul (Marx spunea că anatomia omului este cheia pentru înțelegerea anatomiei maimuței), tot la fel și inferiorul e absolut indispensabil cunoașterii mai profunde a superiorului (nivelul biochimic ne apropie de cunoașterea unor laturi mai profunde ale esenței — inepuizabile în profunzime — a vieții).

În etape diferite, biologia a studiat întîi cauzele mecanice (iatromecanica lui Descartes și Borelli) și apoi pe cele fizico-chimice (secolul al XVIII-lea) ale funcțiilor biologice. Or, necunoașterea dialecticii n-a permis înțelegerea rolului subordonat al proceselor mecanice, fizice și chimice în cadrul vieții. Așa cum Roux și Spemann au redus cauzalitatea morfogenezei la cea mecanică, tot la fel în zilele noastre unii biofizicieni și biochimiști tind să o reducă la o cauzalitate fizico-chimică (microfizică și biochimică). Asistăm la o recrudescență a mecanicismului, îmbrăcat în hainele noi, furnizate de marile progrese ale biologiei moleculare moderne.

Dată fiind unitatea organismului viu, viața trebuie studiată la toate nivelurile ei de organizare, pentru că numai astfel putem realiza o imagine sintetică, atotcuprinzătoare, a esenței ei. Observația biologică tradițională și metodele biologice consacrate în studiul vieții trebuie completate cu cunoașterea nivelului infrastructural, biochimic, folosind metodele noi — biofizice și biochimice. De aceea trebuie să respingem și tezele celor care, ca o ripostă dată exagerărilor unor biofizicieni și biochimiști, neagă sau subestimează valoarea cercetărilor de biofizică și biochimie, pentru că „n-ar fi necesare cunoașterii legilor organismului integral sau ale speciei". În realitate, nivelurile de organizare ale vieții — de la infrastructură la populație și biocenoză — nu pot fi rupte unul de altul și nici unul din ele nu poate fi omis sau subapreciat ca valoare pentru cunoașterea vieții în toată complexitatea ei.

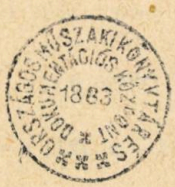
Prezentat la redacție la 7 martie 1966

Catedra de Materialism dialectic și istoric,
Facultatea de filozofie,
Universitatea București

BIBLIOGRAFIE

1. Alpatov V.V., *Unitatea dintre forma biologică și materie*, Buletinul de informare științifică I.S.R.S., *38* (1963).
2. Bernal J.D., *L'échelle des unitées de structure en biopoièse*, La Pensée, *84* (1959).
3. Boiteau P., *Le lamarckisme chimique de Wintrebert*, La Pensée, *108* (1963), p. 72.
4. Boiteau P., *Le coloque de Royaumont et l'information biologique*, La Pensée, *110* (1963), p. 79.
5. Botnariuc N., *Nivelurile de organizare a materiei vii și unele legi specifice lor în lumina materialismului dialectic*, în *Materialismul dialectic și științele naturii*, Edit. Politică vol. X (1965), p. 378—380.
6. Chargaff E., *Amphisbaena*, Agrobiologhia, *5* (1964).
7. Conferința națională de morfologie, vol. VII, Edit. Acad. R.P.R., anexă (1960), *a* — p. 27 ; *b* — p. 47.
8. Cotăescu I., *Materia vie*, Edit. de stat, București, 1962.
9. Florkin M., *Introduction à la biochimie générale*, 1946, *a* — p. 133 ; *b* — p. 127 ; *c* — p. 129 ; *d* — p. 15 ; *e* — p. 13.

10. Feldman M., Yaffe D., Globerson A., *Some Cellular and Molecular Aspects, of Cytodifferentiation*, în *Cellular Control Mechanisms and Cancer*, Amsterdam-Londra-New York, 1964.
11. Frühling L., *Le concept de maladie*, La Nouvelle Critique, *126* (1961).
12. Gulîi M.F., *Viața în lumina datelor științei contemporane*, Analele rom. sov., Biologie, *6* (1962), *a* — p. 47—48; *b* — p. 36.
13. Hailov K.M., *Problema sviazi organizații i evol. jivîh sistem.*, Voprosî Filosofii, *4* (1966), p. 113.
14. Jacob Fr., *Regulatory Devices*, în *The Bacterial Cell Cellular Control Mechanisms and Cancer*, Amsterdam-Londra-New York, 1964.
15. Jacob Fr., J. Monod, *Genetic Repression, Allosteric Inhibition and Cellular Differentiation*, în *Cytodifferentiation and Macromolecular Synthesis*, Academic Press, New York-Londra, 1963.
16. Jugai G.A., *Problemî țelostnosti*, Moscova, 1962.
17. Karpinskaia R.S., *Despre structura și funcția proteinei vii la nivelul molecular*, Probleme de filozofie, *8—9* (1963), *a* — p. 98; *b* — p. 96.
18. Karpinskaia R.S., *O filosofskom probleme molekularnîi biologhii*, Voprosî Filosofii, *1* (1966).
19. Kremianski V.T., *O filosofskom znacenie novîh otkrîtii v oblasti fiziki i himii jivovo*, Voprosî Filozofii, *2* (1964).
20. Kuprianov V.V., *Raportul dintre formă și funcție*, în *Problemele filozofice ale medicinii*, Edit. medicală, 1963, p. 105.
21. Macovschi E., *Unele aspecte cibernetice în problema structurii materiei vii*, St. cerc. biochim., *1* (1964), p. 7.
22. Meerson F. Z., *Dialekticeskoe edinstvo funcktii i strukturî*, Voprosî Filosofii, *11* (1964).
23. Mesrobeanu L., Păunescu E., *Fiziologie microbiană bacteriană*, Edit. Acad. R.P.R., 1960, p. 360.
24. Moraru I., Antohi Șt., *Introducere în genetica moleculară*, Edit. medicală, București, 1964, p. 148—160.
25. Oparin A.I., *Originea vieții pe pământ*, Edit. de stat 1960, *a* — p. 236; *b* — p. 367; *c* — p. 230—242.
26. Săhleanu V., *Chimia, fizica și matematica vieții*, Edit. de stat 1964, p. 261.
27. Sisakian N., *Unele probleme filozofice ale biochimiei*, în *Dialectica marxistă și științele moderne*, Edit. politică 1960, *a* — p. 282; *b* — p. 288; *c* — p. 270.
28. Stugren B., *Știința evoluției*, Edit. politică, 1965.
29. Vvedenov-Kremianski V. I., *Despre specificul structurilor biologice*, Voprosî Filosofii, *1* (1965), p. 93.
30. Wiener F., *Problemele spațiului în lumea vie*, Cerc. filozof., *1* (1962), p. 131.
31. Zbarschi I. B., *Mecanismele moleculare de reglare a biosintezei proteinelor și problema dezvoltării*, Probleme de filozofie, *8—9* (1963), *a* — p. 112; *b* — p. 116.



E 1330

ORSZÁGOS MŰSZAKI DOKUMENTÁCIÓS

STUDII ŞI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE

Tomul 9 (1966)

INDEX ALFABETIC

	Nr.	Pag.
BRAD I., Contribuţii la studiul biochimiei rezistenţei la ger a cerealelor de toamnă. III. Studiul comparativ al activităţii peroxidazei la cerealele de toamnă în timpul iernii	1	11
BRAD I., IV. Studiul comparativ al conţinutului de zahăr direct reducător şi total la cerealele de toamnă în timpul iernii	3	249
BRAD I., V. Studiul comparativ al activităţii dehidrazelor şi respiraţiei la cerealele de toamnă în timpul iernii. Unele diferenţieri legate de potenţialul redox	4	347
BURUIANĂ L. M., Fizico-chimia proceselor enzimatice şi importanţa lor practică (Ref. general)	1	67
BUZILĂ L., Purificarea crioproteinei din mazăre sub control imunochimic	1	21
CÂRSTEANU M., Exosmoza sodiului, potasiului şi calciului din pielea umană în diferite stări patologice	3	263
CHIŞIU N. ŞT., Cenzura proteinoclazică în absorbţia de proteine şi polipeptide din intestin	3	269
COMOROŞAN S., SOLOMON S., VIERU S., STĂNESCU M., Relaţii între activitatea enzimatică la nivel subcelular şi detergenţi, macroanioni şi solvenţi neapoşi	2	147
COTARIU D., RĂDULESCU TR., Deplasarea potasiului şi sodiului din muşchiul striat de broască în contracţie liberă şi contracţie cu travaliu mecanic	3	277
DINESCU G., Modificarea proprietăţilor chimice ale citocromului c sub acţiunea unor substanţe citostatice alchilante	3	283
DINU I., Influenţa suplimentării mălaiului cu vitamine şi aminoacizi asupra activităţii unor enzime din ficat	1	25
FODOR O., BARBARINO F., GRIGORAŞ D., NICOARĂ A., COTUL S., Comportarea enzimelor serice sub acţiunea unor măsuri terapeutice în hepatita cronică. Bazele fiziopatologice şi limitele interpretării modificărilor enzimatice (Ref. general)	3	325

	Nr.	Pag.
FRUNZETI V., Introducerea şi translocarea acidului ribonucleic din Saccharomices cerevisiae şi a acidului dezoxiribonucleic din seminţe de tutun Bel 61—10 în plante de tomate	2	167
FURNICĂ M., Agenţii alchilanţi şi influenţa lor asupra activităţii enzimelor. (Ref. general)	1	81
GHEŢIE V., Degradarea proteinelor de rezervă din sămînţă în procesul germinativ. (Ref. general)	1	91
GHEŢIE V., Sinteza proteinelor de rezervă în cursul coacerii seminţelor. (Ref. general)	3	311
GHEŢIE V., Fluoro-imunoelectroforeza	4	359
MACOVSCHI E., Materia vie şi problema raporturilor dintre medicamente şi enzime	1	3
MACOVSCHI E., Teoria structurii şi repartiţia electroliţilor între lichidul de perfuzie şi muşchii trenului posterior de broască	2	123
MACOVSCHI E., Materia vie şi premize ale unei teorii moleculare a memoriei	3	231
MANTA I., BÎRZU O., POP R., BODEA I., Cercetări asupra rolului nucleului în procesul de respiraţie celulară	2	139
MANTA I., Fracţiunile subcelulare în metabolismul medicamentelor. (Ref. general)	2	197
MOLNAR I. A., WINTER J., TUCICOV E., PELLONI V., URICARU N., Mucopolizaharide din diverse ţesuturi ale tractului digestiv	1	33
MOLNAR I. A., WINTER J., Studiul electroforetic şi metacromatic al mucopolizaharidelor din ţesuturile tractului digestiv	1	39
MOLNAR I. A., SIMIONOVICI M., TUCICOV E., GEORGESCU C. M., WINTER J., Acţiunea mucopolizaharidelor din ţesuturile tractului digestiv asupra metabolismului lipidic	1	49
MOŢET D., Cercetarea imunochimică a înglobării fracţiunilor proteice din serul sanguin uman în coacervatul cu acacia. Consideraţiuni asupra mecanismului de formare a coacervatelor	3	289
MOŢOC D., SEGAL B., Influenţa enzimelor pectolitice ale mucegaiurilor asupra complexului enzimatic al strugurilor	1	57
PĂUNESCU EUG., Modificări enzimatice sub acţiunea tuberculostaticelor (Ref. general)	1	107
PĂUNESCU EUG., Metodă colorimetrică rapidă de dozare a grupărilor aminice libere în produsele biologice	2	191
POPESCU S., SZANTAY I., Cercetarea metabolismului proteic în neuroza generală vegetativă cu iod-albumină marcată	2	187
REICHEL C., LUCACS E., LAPOHOS E., KAPUSI A., MODY E., SZABO ST., Studiul electroforetic şi imunochimic al extractului de ţesut excitoconducător cardiac	2	181
SCOLNIC L., Exosmoza substanţelor reducătoare în diferite stări funcţionale ale muşchiului	3	299
SZANTAY I., DUMITRAŞCU D., Aspecte ale metabolismului metioninei-^{35}S în enteropatii	3	305
TĂNĂSESCU D., Glicoliza şi reglarea sa enzimatică în cursul contracţiei musculare. (Ref. general)	2	207
TĂNĂSESCU D., Participarea în metabolismul muscular a aminoacizilor liberi intracelulari	4	367
TOCILESCU F., GIOSAN E., Valorile glutationului total, redus şi oxidat în sîngele arterial şi venos	4	377
USCHERSOHN H., Structura şi funcţia la nivelul biochimic de organizare a materiei vii. (Ref. general)	4	381

„Studii şi cercetări de biochimie" publică articole originale, de nivel ştiinţific superior, din toate domeniile biochimiei. Sumarele revistei sînt completate cu alte rubrici, ca: *Viaţa ştiinţifică* — în care, prin scurte note, sînt aduse la cunoştinţă cititorilor unele manifestări ştiinţifice din domeniul biochimiei (congrese, simpozioane, consfătuiri, schimburi de experienţă între cercetătorii români şi cei străini etc.); *Recenzii* — în care sînt prezentate cele mai recente lucrări de specialitate apărute în ţară şi peste hotare.

NOTĂ CĂTRE AUTORI

Autorii sînt rugaţi să înainteze articolele, notele şi recenziile dactilografiate la două rînduri. Tabelele vor fi dactilografiate pe pagini separate, iar diagramele vor fi executate în tuş, pe hîrtie de calc. Tabelele şi ilustraţiile vor fi numerotate cu cifre arabe. Figurile din planşe vor fi numerotate în continuarea celor din text. Se va evita repetarea aceloraşi date în text, tabele şi grafice. Explicaţia figurilor va fi dactilografiată pe pagină separată. Citarea bibliografiei în text se va face în ordinea numerelor. Numele autorilor va fi precedat de iniţiale. Titlurile revistelor citate în bibliografie vor fi prescurtate conform uzanţelor internaţionale.

Autorii au dreptul la un număr de 50 de extrase gratuit.

Responsabilitatea asupra conţinutului articolelor revine în exclusivitate autorilor.

Corespondenţa privind manuscrisele, schimbul de publicaţii etc. se va trimite pe adresa Comitetului de redacţie: *str. Docenţilor nr. 20, Bucureşti 2, Raionul 30 Decembrie.*

Lucrări apărute în Editura Academiei Republicii Socialiste România

M. G. BALŞ, **Imunofluorescenţa şi aplicaţiile ei în inframicrobiologie**, 1966, 285 p., 18 pl., 27 lei.

FLORIAN MANDACHE, **Fiziopatologia circulaţiei şi imunitatea în şoc**, 1966, 335 p., 18 pl., 32 lei.

N. SIMIONESCU, **Histogeneza cancerului tiroidian**, 1966, 260 p., 21,50 lei.

* * * **Omagiu lui Mihai Ciucă cu ocazia împlinirii a 80 de ani**, 1965, 487 p., 44 lei.

* * * **Omagiu lui N. G. Lupu cu prilejul împlinirii a 80 de ani**, 1965, 737 p., 5 pl., 64 lei.

* * * **Omagiu lui Şt. Gh. Nicolau**, 1965, 568 p., 48 lei.

ION CANTACUZINO, **Opere alese-Œuvres choisies**, 1965, 687 p., 44 lei.

I. POPESCU şi CARMEN RACOVEANU, **Insuficienţa respiratorie cronică de origine extrapulmonară**, 1965, 213 p., 22,50 lei.

VOINEA MARINESCU şi colab., **Catecolaminele**, 1965, 473 p., 39 lei.

ŞT. S. NICOLAU şi N. CONSTANTINESCU, **Rickettsii şi ricketsioze**, 1965, 803 p., 56 lei.

ALEXANDRU RĂDULESCU şi CLEMENT BACIU, **Genunchiul** (Studiu clinic şi terapeutic), 1965, 439 p., 34 lei.

O. SAGER, A. MAREŞ şi V. NEŞTIANU, **Formaţia reticulată**, 1965, 359 p., 23 lei.

ST. CERC. BIOCHIMIE, TOMUL 9, NR. 4, P. 337 — 392, BUCUREŞTI, DECEMBRIE 1966

I. P. Informaţia. — c. 3781

43 816

Lei 12. —